

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1937

THÈSE

N°

258

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jacques-Charles-Eugène SCHWARTZ

Né le 20 Juin 1905, à PARIS (Seine)

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA
TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE M. J. DUMAS

(Institut Pasteur)

Président : M. Robert DÉBRÉ, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1937

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1937

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jacques-Charles-Eugène SCHWARTZ

Né le 20 Juin 1905, à PARIS (Seine)

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE LA

TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE M. J. DUMAS

(Institut Pasteur)

Président : M. Robert DEBRÉ, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1937

I. — Professeurs

	MM.
Anatomie	ROUVIERE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	OLONOVSKI.
Bactériologie	Robert DEBRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROC'SSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TUFI NEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL.
Pathologie expérimentale et comparée	LAVASTINE.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	RIESSINGER.
	Maur. VILLARET.
Clinique médicale	LOEPER.
	CARNOT.
	Marcel LABBE.
	CLERC.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale	CUNEO.
	GOSSET.
	GREGOIRE.
Clinique ophtalmologique	LENORMANT.
Clinique urologique	TERRIEN.
	MARION.
Clinique d'accouchements	BRINDEAU.
	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGEANT.
Clinique de la Tuberculose	BEZANCON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
Clinique cardiologie	LAUBRY.
Professeurs sans chaire	HOVELACQUE.
	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — Agrégés en exercice

MM.

AMELINE.....	Pathologie chirurgicale.
BARIETY	Pathologie médicale.
BENARD Henri	Pathologie médicale.
BERNARD Et... ..	Pathologie médicale.
BESANCON (J.)	Hydrologie.
BOULIN	Pathologie médicale.
BULLIARD	Histologie.
CATHALA	Pathologie médicale.
CHEVALLIER ..	Pathologie médicale.
COSTE	Pathologie médicale.
DOGNON	Physique.
FEY	Urologie.
FUNCK	
BRENTANO	Pathologie chirurgicale.
GALLIARD	Parasitologie.
GASTINEL	Bactériologie.

MM.

DE GAUDART	
D'ALLAINES	Pathologie chirurgicale.
DE GENNES...	Pathologie médicale.
GAYET	Physiologie.
GIROUD	Histologie.
HAGUENAU ...	Pathologie médicale.
HALPHEN	Oto-rhino-laryngologie.
HAZARD	Pharmacologie.
HUGUENIN	Anatomie pathologique.
JOANNON	Hygiène.
LACOMME	Obstétrique.
LANTUEJOUL..	Obstétrique.
LAROCHE Guy.	Pathologie médicale.
LELONG	Pathologie médicale.

MM.

LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
LEVEUF	Pathologie chirurgicale.
LEVY (M ^{le} J.)..	Pharmacologie.
LEVY-VALENSI.	Neurologie et Psychiatrie
MENEGAUX ...	Pathologie chirurgicale.
MOLLARET ...	Pathologie médicale.
MOREAU.....	Pathologie médicale.
MOULONGUET.	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN.....	Pathologie médicale.
OVERLING	Anatomie pathologique.
PETIT-	
DUTAILLIS	Pathologie chirurgicale.

MM.

PIEDELIEVRE .	Médecine légale.
PORTES	Obstétrique.
RENARD (L.) .	Ophtalmologie.
RICHET	Physiologie.
SANNIE	Chimie biologique.
SENEQUE	Pathologie chirurgicale.
TROISIER	Pathologie expérimentale
TURPIN	Pathologie médicale.
VIGNES	Obstétrique.
WILMOTH	Pathologie chirurgicale

III. — Agrégés rappelés à l'exercice pour le service des examens

MM.

ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.
CHAILLEY-	
BERT.....	Physiologie.
GUENIOT.....	Obstétrique.

MM.

LARDENNOIS....	Pathologie chirurgicale.
LEROUX	Anatomie pathologique
NEVEU-	
LEMAIRE ...	Parasitologie.
PHILIBERT ...	Bactériologie.
VAUDESCAL.....	Obstétrique.

IV. — Agrégés chargés de cours de clinique annexe à titre permanent

MM

ALAJOUANINE..	} Clinique médicale.	
AUBERTIN		
BRULE		
CHABROL		
CHIRAY		
DONZELOT		
DUVOIR.....		
LIAN		
PASTEUR-		
VALLEY-RADOT		
SEZARY		

MM.

BASSET	} Clinique chirurgicale	
BROCQ		
CADENAT		
GATELLIER ...		
HEITZ-BOYER .		
MOURE		
QUENU		
SCHWARTZ		
VELTER		
ECALLE		
LE LORIER	} Clinique obstétricale.	
LEVY-SOLAL ..		
METZGER		

V. — Chargés de cours

MM.

CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
PHILIBERT, agrégé	Microbiologie.
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLE	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées, comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

AUX MIENS

ET

A MES AMIS

A Monsieur le Professeur ROBERT DEBRE

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Docteur LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur

*Qui nous a accueilli à l'Institut Pasteur
et encouragé au cours de ce travail, hom-
mage de respectueuse gratitude.*

A Monsieur le Docteur DUMAS

*Dont les conseils et la bienveillance
nous ont été précieux pendant les quatre
années que nous avons passées dans son
laboratoire.*

A Monsieur le Docteur LEGROUX

*Qui s'acquiert, par son enseignement, un
gage de gratitude auprès de tous les élè-
ves de l'Institut Pasteur.*

A mes Maîtres dans les Hôpitaux

*Dont l'enseignement quotidien a été
pour nous le profit et le charme de tant
d'années.*

Stage

- 1923 M. le Professeur SERGENT.
- 1924 M. le Professeur LEJARS (*in memoriam*).
- 1924 M. le Professeur GREGOIRE.
- 1925 M. le Docteur L. RAMOND.

Externat

- 1926 M. le Professeur GREGOIRE.
- 1927 M. le Docteur RIVET.
- 1928 M. le Professeur Agrégé SEZARY.

Externat en premier

- 1929 M. le Professeur Agrégé HEITZ-BOYER.
- 1929 M. le Professeur Agrégé MOREAU.
- 1930 M. le Professeur Agrégé METZGER.

Internat

- 1932 (INTERNAT BÉNÉVOLE) M. le Docteur RIST.
- 1933 M. le Docteur R. BENARD.
- 1934 M. le Docteur LOUSTE (*in memoriam*).
- 1934-35 M. le Professeur Agrégé MOREAU.
- 1935-36 M. le Docteur GRENET.
- 1936-37 M. le Professeur Agrégé ALAJOUANINE.

INTRODUCTION

La connaissance des poisons élaborés par les staphylocoques résulte des travaux de nombreux expérimentateurs et la notion d'une toxine staphylococcique s'est précisée peu à peu.

Rodet et Courmont, en 1892, avaient reconnu dans les filtrats de cultures l'existence de substances qui favorisaient l'infection expérimentale des animaux par les staphylocoques virulents.

En 1895, Van de Velde démontra le pouvoir cytolitique des cultures filtrées de staphylocoques. Ce pouvoir s'exerce très nettement sur les leucocytes *in vitro* et *in vivo*. Il l'attribue à une substance à laquelle il donne le nom de *leucocidine*. La leucocidine est thermolabile. Elle est aussi antigénique, mais son action n'est pas limitée aux globules blancs. Elle s'exerce aussi sur les cellules nerveuses sympathiques, sur les hémato blastes et sur les globules rouges qui se « dissolvent ».

Neisser et Wechsberg, en 1901, insistent sur ce pouvoir hémolytique des filtrats staphylococciques. Ils l'attribuent à une hémolysine distincte de la leucocidine.

En 1914, Dumas, étudiant les caractères de culture des staphylocoques humains et animaux, insiste sur

leur pouvoir hémolytique. Nicolle et Césari étudient les propriétés toxiques des mêmes germes. Ils décrivent le pouvoir hémolytique, le pouvoir nécrosant et le pouvoir mortel des cultures totales ou filtrées. Ils attribuent ces trois pouvoirs à une substance unique et lui donnent le nom de toxine staphylococcique.

Walbum, en 1922, précise les conditions favorables à la production de toxine. Il ne considère que son action sur les globules rouges et la désigne sous le nom d'hémolysine.

En 1924, Julia Parker remet au premier plan l'action nécrosante du poison staphylococcique dans le derme.

En 1928, survient à Bundaberg (Australie) un accident, d'abord inexpliqué, au cours de vaccinations antidiphthériques : plusieurs enfants, ayant reçu en injection un mélange de toxine et d'antitoxine diphthériques, moururent rapidement avec des symptômes évidents d'intoxication. L'examen du mélange qui avait été injecté montra qu'il était infecté par des staphylocoques hémolytiques. Cette constatation eut un grand retentissement. A la suite du rapport de la Commission royale d'enquête sur l'accident de Bundaberg, Burnet entreprend en 1929 une série de travaux qui lui assurent une propriété incontestable dans l'étude de la toxine staphylococcique. Il en perfectionne la production par l'emploi d'une atmosphère d'air et de CO_2 au-dessus des cultures. Il étudie son pouvoir antigène, sa transformation en anatoxine par le formol, conformément à la décou-

verte de Ramon pour la toxine diphtérique ; il précise les modalités particulières des floculations de toxine-antitoxine et l'appréciation du point de neutralisation.

Après Burnet, les travaux se multiplient dans tous les pays : un grand nombre d'expérimentateurs ont pour but l'application thérapeutique des dérivés de la toxine. Ils étudient le rôle de la toxine dans les affections à staphylocoques par les cuti-réactions (G. Remé, 1930), les intra-dermo-réactions (Kobak et Pilot, 1931), le dosage de l'antitoxine dans le sérum (Bryce et Burnet, 1932 ; Gross, 1933). Ils publient les résultats du traitement des affections à staphylocoques par l'anatoxine (Dolman, 1933) ou le sérum antitoxique (Panton et Valentine, 1931).

D'autres poursuivent l'étude de la toxine elle-même. Gengou précise ses rapports avec les autres antigènes du staphylocoque (1930-1932). Forssman étudie le processus de l'hémolyse (1935). Glenny et Stevenus distinguent la toxine α et la toxine β (1935).

En 1933, Nélis commence la publication d'une série de travaux qui apportent des précisions sur la production de la toxine, ses propriétés *in vitro* et *in vivo*, l'immunité antitoxique et le rôle du sérum antitoxique.

A partir de 1934, G. Ramon, seul ou avec divers collaborateurs, établit les bases rationnelles du traitement spécifique des affections staphylococciques. Il perfectionne la production de la toxine, l'appréciation de sa valeur antigène, sa transformation en ana-

toxine. Il étudie la genèse de l'immunité antitoxique, son mode d'action dans les maladies naturelles et expérimentales. Il éclaire le problème de l'immunité naturelle antistaphylotoxique. Aidant la diffusion en France du traitement par l'anatoxine staphylococcique, il en publie les résultats favorables, confirmés par Debré et ses collaborateurs. H. Bonnet a étudié la réaction de fixation de l'alexine dans les infections à staphylocoques et a montré que la toxine est l'antigène le plus sensible. Il a spécialement étudié la production de la toxine et l'intra-dermo-réaction à la toxine chez l'homme.

*
* *

Le grand nombre des recherches publiées sur ce sujet nous a incité à n'étudier que la toxine staphylococcique. *On ne trouvera ici aucune étude sur l'anatoxine, l'antitoxine ou sur la clinique des maladies à staphylocoques.*

Nous avons entrepris l'étude de la toxine staphylococcique en 1934, à l'instigation de M. le Docteur Louis Martin, Directeur de l'Institut Pasteur. Nous l'avons poursuivie grâce aux conseils de M. J. Dumas et dans son laboratoire.

Pendant la durée de notre internat dans les hôpitaux, nous avons pu, grâce à une bourse d'études à l'Institut Pasteur, compléter notre formation clinique par un travail bactériologique assidu. Nous achevons cette période avec un sentiment de regret pour la brièveté des années écoulées et de reconnaissance pour l'enseignement de nos Maîtres.

PREMIERE PARTIE

PRODUCTION DE LA TOXINE

CHAPITRE PREMIER

CHOIX DES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES

Tous les staphylocoques ne sont pas toxigènes. Non seulement il existe des degrés dans l'activité des toxines secrétées, mais il faut savoir aussi qu'un grand nombre de staphylocoques ne produit pas du tout de toxine. Il importe donc d'opérer un choix. Mais sur quels indices ?

Les *caractères de culture* habituellement recherchés en microbiologie ne permettent pas de désigner les souches qui seront toxiques.

Pigment. — La production de toxine n'est pas l'apanage des staphylocoques dorés. Sans doute, ceux-ci fournissent-ils un grand nombre des souches toxiques, mais il arrive que des staphylocoques blancs qui, par leur origine et leur pigmentation, passeraient pour non pathogènes, produisent une toxine très active. Parmi ces souches blanches, les unes sont telles dès leur isolement, les autres le deviennent secondairement et Burnet a signalé [29] que la culture d'une souche dorée toxigène en atmosphère de CO_2 donne naissance à des variantes blanches, stables, toxi-

gènes elles-mêmes et présentant tous les caractères de leur souche originelle, sauf la pigmentation. Plus les filtrats de culture sont toxiques, plus on trouve de colonies blanches quand on réensemence ces cultures sur gelose afin d'obtenir des colonies isolées. Il a illustré ce fait en utilisant les variantes blanches de sa souche Wood (dorée à l'isolement) pour produire des toxines actives.

Personnellement nous n'avons jamais observé de tels faits. Aucune variante blanche apparue dans nos cultures sous CO_2 d'une souche dorée, ne s'est maintenue blanche. Quelques ensemencements sur pomme de terre ou passages sur l'animal ont fait reparaître une teinte crème ou jaune sale.

La pigmentation nous paraît donc sans valeur pour discerner les souches toxigènes.

La liquéfaction de la gélatine est un caractère habituel aux staphylocoques. Notons que quelques staphylocoques sans action sur la gélatine se sont montrés toxigènes.

La liquéfaction du sérum coagulé est exceptionnelle. Il est à remarquer que Minnet [141] a isolé une souche qui présentait à la fois cette propriété et un haut pouvoir toxigène. Nos souches 19 et 24 donnaient des colonies qui, dès le troisième jour, s'enfonçaient nettement dans le sérum coagulé. Leur valeur toxigène était faible.

La fermentation des glucides ne donne aucun indice sur l'aptitude des souches à produire la toxine.

Nous discuterons au chapitre suivant le rôle du glucose dans la production de la toxine.

Le pouvoir hémolytique est une caractéristique majeure de la toxine staphylococcique. On est donc en droit de penser que les colonies qui s'entourent d'un halo d'hémolyse sur gélose au sang seront probablement toxigènes. Mais la gélose au sang est habituellement préparée dans les laboratoires avec du sang de cheval. Or la toxine lyse les globules de lapin à un taux beaucoup plus élevé que les globules de tout autre animal. De plus l'hémolysine n'apparaît souvent en quantité notable que dans les cultures faites sous atmosphère de CO_2 . La recherche de l'hémolyse dans les conditions ordinaires (ensemencement sur gélose-sang-de-cheval) ne réalise donc pas les conditions les plus favorables à la mise en évidence de la toxine. On observera fréquemment des souches dont les colonies ne sont pas hémolytiques dans ces conditions imparfaites et qui se révèlent toxigènes quand la culture est faite dans les conditions convenables.

Mais l'inverse s'observe également. Une de nos souches (n° 8) hémolysait fortement la gélose au sang (halo de 5 mm.) alors qu'elle ne produisait qu'une toxine médiocre. Bigger, Boland, O Meara [11], Seifert [214] ont signalé des faits identiques.

La provenance des souches, humaine ou animale, est sans importance pour leur valeur toxigène. Voici le relevé de l'origine de plusieurs souches et de la valeur de la toxine produite :

TABLEAU I

Désignation de la souche	Origine	Pigment	Dose minima hémolytique en cc.	Dose-test hémolytique
Pac.	Septicémie	Doré	1/100	
Fer.	Septicémie	Doré	1/100	
A5	Septicémie	Doré	1/200	
P. R.	Septicémie	Doré	1/200	
1	Furoncle	Doré	> 2	
2	Furoncle	Doré	1/1000	
Tor.	Anthrax	Doré	1/10	
3	Panaris	Doré	1/1500	
4	Ostéomyélite	Doré	1/100	
5	Ostéomyélite	Doré	1/200	
Cach.	Ostéomyélite	Doré	1/10	
Phil.	Ostéomyélite	Doré	1/10	
Char.	Ostéomyélite	Doré	1/10	
6	Pleurésie puru- lente	Doré		0,20
7	Pleurésie puru- lente	Doré		0,20
Pic.	Pleurésie puru- lente	Doré	1/10	
Lit.	Pleurésie puru- lente	Doré	1/50	
Just.	Plaie cancéreuse de la face	Blanc	1/10	

Désignation de la souche	Origine	Pigment	Dose minima hémolytique en cc.	Dose-test hémolytique
R.	Néoplasme du cou	Doré	1/10	
RE3	Ganglion mé- sentérique d'un malade mort de colite hé- morragique .	Doré	1/200	
8	Gorge saine . . .	Doré	1/10	
III	Gorge saine . . .	Doré	1/2000	
XIII	Gorge saine . . .	Doré	1/500	
Barbier I.	Gorge saine . . .	Doré	1/100	
Barbier II.	Mucus nasal (même sujet que Barbier I)	Doré	1/1500	
Bass.	Angine	Blanc	1/500	
9	Angine	Doré	1/10	
10	Angine	Doré	1/100	
11	Angine	Blanc	1/200	
12	Saprophyte de l'urèthre . . .	Blanc		> 1 cc.
13	Plegmon péri- néphrétique .	Doré	1/1000	
Provenance animale				
14	Démodécie du chien	Jaune sale	1/10	
15	Métrite de la chienne	Jaune sale	> 2	

Désignation de la souche	Origine	Pigment	Dose minima hémolytique en cc.	Dose-test hémolytique
16	Mammite gan- gréneuse d'une brebis .	Doré	1/3000	0,08
17	Abcès sous-cu- tanés multi- ples du jeune lapereau . . .	Doré	1/10	
18	Septicémie de la poule . . .	Blanc	> 2	
19	Conjonctivite du lapin . . .	Blanc	> 2	
20	Maladie du nez du lapin (si- nus maxil- laire)	Blanc		> 0,5
21	Mammite de la lapine	Doré	1/1500	

Les staphylocoques pathogènes pour l'homme, isolés au cours de maladies, sont souvent peu toxigènes. Par contre les staphylocoques saprophytes peuvent fournir une excellente toxine et, parmi ceux-ci, nous soulignons la valeur des souches isolées du naso-pharynx (souche III et Barbier III). Les staphylocoques humains provenant de lésions superficielles et cutanées (acné, furoncles, etc.) sont souvent toxiques, tandis que ceux qui viennent de lésions profondes (ostéomyélite, septicémie, phlegmon périnéphrétique) le sont beaucoup plus rarement. Les staphylocoques

que nous avons isolés de l'ostéomyélite et des septicémies étaient particulièrement peu toxiques.

Les staphylocoques de provenance animale donnent un pourcentage de souches toxigènes voisin de celui des staphylocoques humains. A deux reprises, Nicolle et Cesari [165] ont obtenu une toxine remarquablement active avec deux staphylocoques provenant de mammite gangréneuse des brebis. A notre tour, une souche de même origine isolée en 1934 nous a servi à produire nos échantillons de toxines les plus actives (souche n° 16).

Mais la véritable particularité des staphylocoques animaux serait de produire en abondance la toxine β que nous étudierons dans la troisième partie de ce travail. Minnett [141] a noté que sur 97 staphylocoques de provenance animale, 92 produisent des quantités variables de toxine β ; parmi eux, 10 produisent cette toxine β à l'exclusion de la toxine α .

Enfin le *pouvoir pathogène expérimental* des staphylocoques toxiques est très variable. Beaucoup d'entre eux injectés dans les veines tuent le lapin en 24 à 48 heures avec congestion des reins, sans lésions suppuratives. Cette évolution rapide est déterminée par l'action brutale de la toxine. D'autres souches, ou les précédentes à doses plus faibles, provoquent des abcès des reins, du cœur et des psoas, semblant agir comme les microbes pyogènes (souche Wood). D'autres, enfin, sont très faiblement pathogènes. Même à forte dose, l'animal maigrit progressivement

et meurt en 15 à 20 jours de cachexie progressive sans lésions suppuratives rénales.

Pour nous résumer nous pouvons dire que ni les caractères de culture, ni la provenance, ni l'action pathogène d'un staphylocoque ne le désigne comme devant produire une toxine active. Seules la mise en culture dans les conditions convenables et l'étude du filtrat donnent des renseignements sur la valeur toxigène d'une souche.

CHAPITRE II

ATMOSPHERE DE CO_2

Plus que toute autre condition de culture, l'emploi d'une atmosphère contenant du gaz carbonique favorise l'apparition de la toxine. Cette découverte est due à Burnet (1929) [29]. On peut dire que c'est elle qui a permis l'obtention de toxines actives et qui a été l'origine et la condition de tout le renouveau d'études faites sur les staphylocoques depuis cette date.

C'est la proportion de 20/100 de CO_2 pour 80/100 d'air qui a paru à Burnet la plus efficace. A un taux plus élevé l'action est la même. Et pour un taux extrême de 94/100 la culture devient minime et la production de toxine, nulle. Ces résultats ont partout été confirmés. Certains auteurs ont utilisé des dispositifs fermés où, après avoir fait le vide, on laisse entrer au-dessus de la culture le mélange d'air et de CO_2 (L. Hohn [108], Burnet Freeman [32]) ou de gaz d'éclairage (Combiesco [40]), qui n'est pas renouvelé jusqu'à l'expiration du temps de culture. Pour que le taux de CO_2 reste constant, la plupart des expérimentateurs recourent à une circulation de

gaz au-dessus des cultures placées dans des flacons à deux tubulures. Le mélange gazeux peut être fait dans de larges flacons d'une vingtaine de litres qui suffisent à la consommation d'une journée. On refoule le mélange gazeux contenu dans ce grand flacon en y faisant arriver de l'eau goutte à goutte ; à mesure que le niveau de l'eau monte, les gaz sont chassés et amenés par un tuyau de caoutchouc dans les flacons de culture. Ce procédé a été utilisé par Nélis [149]. Il nécessite un appareillage encombrant et des manipulations quotidiennes.

On le remplace avec avantage par un tube d'acier, d'un modèle courant dans l'industrie, contenant 2 mètres cubes du mélange gazeux, CO_2 et air. Il importe que les gaz soient sous pression (150 kgs) et non à l'état liquide. Dans ce dernier cas, la distillation de l'air et du CO_2 ne se faisant pas pour des températures et des pressions identiques, le dégagement ne contiendrait pas les mêmes proportions des deux gaz au début et à la fin de l'expérience. Le dégagement convenable est obtenu par un détendeur et contrôlé par un flacon laveur où le gaz s'échappe bulle à bulle. Un second flacon laveur sera placé après le dernier vase de culture pour s'assurer de la circulation des gaz. Il est recommandé de paraffiner les bouchons de caoutchouc à deux tubulures qui ferment l'orifice des vases de culture, et de ligaturer les tuyaux de caoutchouc qui relient les tubulures entre elles. De la sorte il ne se produit aucune fuite. Les bourres de coton introduites à l'orifice des tubu-

lures doivent être parfaitement sèches, sous peine de créer un obstacle à la circulation des gaz. Les bouchons de caoutchouc avec leurs tubulures sont enveloppés de papier fort et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 115°. Lors de la stérilisation quelques gouttelettes d'eau se condensent sur les tubes de verre. Il suffit tout simplement de laisser à l'étuve pendant un ou deux jours ces bouchons montés pour obtenir la disparition des gouttes d'eau et la perméabilité des bourres de coton au gaz. Ce n'est qu'après ensemencement du milieu de culture qu'on monte bouchons et tubulures sur les flacons. Ceux-ci doivent présenter une large surface à leur partie inférieure pour que le milieu soit en large contact avec le mélange d'air et de CO². Nous nous sommes servi habituellement de flacons d'Erlenmeyer pour obtenir des échantillons de 150 cc. de culture et de fioles de Fernbach pour des quantités plus importantes (500 cc.).

On améliore sensiblement la production de la toxine quand on prend soin de répartir le bouillon sur une faible hauteur (un travers de doigt), de façon que les germes qui cultivent en profondeur ne soient pas complètement soustraits à l'action du CO².

L'emploi du CO² permet d'obtenir des toxines habituellement 10 ou 20 fois plus actives que par culture ordinaire au contact de l'air.

TABLEAU II

Doses hémolytiques minima des filtrats

Cultures sans CO ₂	Cultures avec CO ₂
1/200	1/2000
1/10	1/2000
1/200	1/2000

Plusieurs auteurs ont observé des exceptions à cette règle. Bigger [11], Minnett [141] ont signalé des staphylocoques dont les filtrats étaient plus actifs quand la culture était faite au contact de l'air, qu'en l'absence de CO₂. Bien avant lui Burnet [29] avait signalé que les variantes blanches apparues dans ses cultures sous CO₂ étaient, elles, toxigènes sans l'intervention de CO₂. La variante blanche de la souche Wood, que nous avons pu étudier, élabore autant, ou plus de toxine, au contact de l'air qu'au contact du CO₂.

Souche Wood

Culture à l'air . . . 1/3000

Culture sous CO₂ . 1/2500

Mais cette souche est la seule qui ait présenté cette propriété, parmi celles que nous avons étudiées.

Nous avons fait divers essais, tous infructueux, pour nous affranchir du CO₂.

C'est ainsi que la culture en anaérobiose ne donne que des quantités insignifiantes de toxine, (Burky [22]) avec une quantité considérable de produits d'autolyse microbienne.

Les cultures en atmosphère confinée de gaz d'éclai-

rage à diverses concentrations produisent des toxines médiocres.

Enfin, nous avons essayé d'obtenir un dégagement de CO^2 au sein même de la culture par les expériences suivantes.

Notre milieu de culture habituel était additionné de glucose afin que la fermentation de ce sucre par le staphylocoque amenât une forte acidité (pH 5,6 à 5,8). Cette acidité était mise à profit pour décomposer avec dégagement de CO^2 du carbonate de chaux ou de bicarbonate de soude, contenus en excès dans le milieu. Mais la stérilisation de tels milieux était difficile et devait se faire à basse température (3 jours à 100°) ou par filtration pour éviter la décomposition des sels. Les filtrats obtenus étaient dépourvus de valeur toxique. Walbum [233] a d'ailleurs signalé le rôle empêchant des sels de Ca sur la production de toxine et sur la mesure de son activité hémolytique.

Quel est le mode d'action du CO^2 ?

Nous verrons en étudiant le pH des cultures que le CO^2 n'agit pas absolument comme tampon. Burnet [29] a proposé comme explication le pouvoir qu'aurait ce gaz de modifier le *pH intra-cellulaire*, invoquant les travaux de Jacobs (1924). Burnet admet que l'acidité intracellulaire est plus importante que celle du milieu et qu'elle résulte de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions H. Normalement le staphylocoque doré ne posséderait pas cette perméabilité. Le CO^2 la lui ferait acquérir. Quant aux

variantes blanches elles posséderaient la perméabilité en question, ce qui expliquerait qu'elles puissent se passer de CO_2 et élaborer la toxine.

Mais il n'y a pas de preuves formelles de ces hypothèses.

CHAPITRE III

Milieux de culture

La toxine staphylococcique est une exotoxine qui diffuse dans les milieux de culture. Il semble donc naturel d'utiliser des milieux liquides dont on séparera les microbes par centrifugation ou filtration. Mais dans de tels milieux les microbes qui végètent en profondeur échappent à l'influence de l'atmosphère gazeuse (CO_2). Toutefois, les milieux liquides sont à recommander pour obtenir des quantités importantes de toxine.

Milieux solides. — Burnet [29] et Bigger, Boland et O'Meara [11] ont utilisé des milieux solides (gélose) où les microbes végètent en surface, en contact avec l'atmosphère de CO_2 . Après culture, la surface de la gélose est lavée à l'eau physiologique pour entraîner les microbes. On centrifuge et le liquide surnageant constitue la toxine liquide. Selon une technique différente, la gélose lavée avec 10 cc. d'eau physiologique est hachée dans un hachoir à viande, et centrifugée. D'après Burnet [29] le liquide obtenu de la sorte possède un titre hémolytique incomparablement plus élevé (7.200) que les corps microbiens

(160) ou que l'eau ayant servi à émulsionner les bactéries (960). Les milieux solides contiennent donc une toxine très hémolytique, mais ils n'en produisent que quelques centimètres cubes. C'est ce qui nous a fait rejeter leur emploi.

La gélose demi-molle, ou bouillon gélosé à 0,8 %, présente le même avantage de culture en surface et fournit un volume de liquide égal à la moitié de la gélose. Après culture, on découpe la gélose en petits morceaux que l'on met à filtrer sur 2 ou 4 épaisseurs de gaze molle, puis sur un filtre en papier préparé avec la terre d'infusoires. Cette méthode a été employée par Burnet en 1931. Elle ne nous a pas donné un résultat supérieur à l'emploi des milieux liquides. Bien au contraire, au cours d'une série d'expériences faites avec du bouillon contenant de 3 à 5 0/00 de gélose nous avons obtenu des toxines dont la dose test hémolytique était de 0 cc. 15 ; le même bouillon, non gélosé, donnait une toxine dont la dose-test était de 0 cc. 10.

Les *milieux liquides* employés par les divers expérimentateurs sont de formule différente. Aucun auteur n'a obtenu de toxine active à partir d'un milieu synthétique. Burky entre autre, signale l'impossibilité d'obtenir des toxines en milieu d'Uchinsky (Burky [22]). Holm [108] déclare utiliser un milieu semi-synthétique contenant 20 0/00 de peptone « proteose Difco » et différents sels.

	Grammes	
NaCl	5	} pH entre 7,6 et 8,0
K H ₂ PO ₄	1	
K ₂ H PO ₄	1	
Mg SO ₄	0,2	
Ca Cl ₂	0,1	
Lactate d'ammoniaque	5	
Eau distillée	1.000	
Peptone « protéose Difco »	20	

La plupart des auteurs ont employé des milieux d'obtention empirique dont la base est la macération ou la décoction de viande animale, veau, bœuf ou cheval, additionnée de peptone.

La plupart des auteurs étrangers utilisent des peptones sèches, en poudre, fabriquées industriellement. Beaucoup d'expérimentateurs se servent de la peptone Martin, peptone liquide fabriquée au laboratoire par la digestion de panses de porc.

Voici le mode de préparation du bouillon préconisé par Nélis [147] en 1933 et qui nous a servi pour de très nombreux essais :

« A un litre d'eau, on ajoute 10 cc. d'acide chlorhydrique et 225 gr. de panse de porc fraîche et découpée en menus morceaux. On porte au bain-marie à 45° ; au bout de deux heures environ, on ajoute 325 gr. de viande de veau hachée, puis on brasse le mélange. Après 20 à 22 heures on arrête la digestion par chauffage à 100° pendant 20 minutes. On filtre alors sur une chausse et on alcalinise le milieu au moyen de lessive de soude pour l'amener à pH 7. On chauffe à nouveau pendant 20 minutes à 100°. On

filtre sur papier. On répartit dans les fioles d'Erlenmeyer à deux tubulures et on stérilise à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes. »

C'est très exactement la formule même que Ramon préconisait la même année pour la production de toxine diphtérique de valeur antigène intrinsèque élevée (Ramon [183]). Il s'en servait pour la production de toxine staphylococcique (Ramon [195]), en s'abstenant d'y introduire de l'acétate de sodium. Toutefois le bouillon de Nélis est ajusté au pH 7,0. Celui de Ramon au pH 8,0. Ultérieurement chacun de ces auteurs a poursuivi la recherche de milieux favorables et publié de nouvelles formules.

Ramon, en 1936, étudiant les qualités des milieux qui permettent facilement la transformation des toxines en anatoxines préconise deux formules nouvelles (Ramon [184]).

L'une comporte le mélange de peptone Martin, obtenue selon la technique classique et de macération de viande de veau faite à froid (600 gr. de veau par litre d'eau), dans les proportions de 2 parties de peptone pour 1 partie de liquide de macération. Le pH est ajusté à 7,5. On ajoute 12 gr. de tartrate de sodium par litre comme tampon.

L'autre, établi en collaboration avec Berthelot et Mlle Amoureux, est une décoction de rate de veau additionnée de peptone du commerce. « A un litre d'eau on ajoute 500 gr. de rate de veau décapsulée et réduite en pulpe. On fait bouillir pendant une heure et on passe à travers une chausse. Le liquide est en-

suite additionné de peptone pepsique de viande de bœuf (peptone P. B. C. Vaillant) à raison de 15 gr. par litre ; puis il est ajusté (à la température de l'ébullition) à pH 7,5 au moyen d'une solution de carbonate de soude. Après chauffage, à 100° pendant 20 minutes, le bouillon est filtré sur papier Laurent. On l'additionne alors d'un sel tampon... le tartrate de sodium, qu'on ajoute au bouillon à raison de 12 gr. par litre. »

Nélis, un peu plus tard, a indiqué la composition d'un milieu préparé uniquement avec de la peptone Martin. A un litre d'eau on ajoute 10 cc. d'acide chlorhydrique pur. On porte à 45° et on ajoute 275 gr. de panse non dédoublées (muqueuse et musculuse). La digestion se poursuit 15 à 18 heures à 45°, puis on filtre, on ajuste au pH 7,5, on précipite et on stérilise par filtration sur filtre Seitz. Nélis conseille l'addition de 1 gr. 50 de glucose par litre et déconseille l'emploi de sels tampons.

Ces milieux trouvent leurs indications respectives selon les aptitudes de la souche qui y cultive et Ramon signale lui-même que le bouillon à base de rate de veau ne donne des résultats excellents qu'avec une seule souche de staphylocoques parmi celles qu'il a éprouvées.

CHAPITRE IV

Rôle de la peptone et des acides aminés

Le premier milieu de Nélis est obtenu en réalisant, en somme, la digestion pepsique de la viande de veau dans une digestion acide de panse de porc. Cette digestion est toujours très incomplète après 20 à 22 heures et une grande quantité de viande reste sur le filtre.

Nous avons pensé améliorer le milieu de Nélis en y ajoutant un tiers de décoction de viande de veau préparée à part, et nous avons, en effet, obtenu un milieu plus favorable comme le montrent les expériences suivantes.

TABLEAU IV

Milieu	Dose-test hémolytique	D.M.M. (lapin)	D.M.M. (cobaye)
Nélis	0 cc. 28	0 cc. 5	1/40 cc.
Nélis + 1/3 décoction de viande de veau	0 cc. 20	0 cc. 5	1/80 cc.

Nous avons désormais préparé séparément les produits d'hydrolyse de la panse de porc et le bouillon

de viande de veau. Une première question se posait : si l'on emploie la macération de viande seule, et la peptone seule, le staphylocoque élabore-t-il la toxine ?

Dans ses expériences de 1894, J. Courmont [45] emploie un bouillon de viande salé, sans addition de peptone. Gengou signale, au contraire, que certaines souches cultivent en eau peptonée seule et produisent de la toxine. Sans doute s'agit-il bien de caractères particuliers à certaines souches. Pour celle (n° 16) qui nous servait à expérimenter, l'union des deux produits était indispensable et toute culture dans l'un ou l'autre de ces produits, seul, ne donnait qu'une toxine négligeable dont la dose-test était supérieure à 1 cc. Nous inspirant des recherches de Loiseau et Philippe [131 à 135] concernant la toxine diphtérique, nous avons cherché :

1° Quelles étaient les proportions les plus favorables des deux composants dans le milieu de culture ;

2° Quel était le temps de digestion de la panse le plus favorable.

La digestion de la panse de porc était conduite de façon toujours identique, ainsi qu'il suit : on dégraisse le plus possible la panse, et sans la dédoubler, c'est-à-dire sans séparer la muqueuse de la musculuse, on la passe dans le hachoir à viande. 225 gr. de panse hachée sont introduits dans un litre d'eau tiédie à 45° et additionnée de 10 cc. d'acide chlorhydrique pur. Ce mélange est contenu dans un récipient de terre vernissée, et porté au bain-marie à 45°. Après le temps de digestion choisi (qui seul était va-

riable) on élève la température à 80° pendant 20 minutes afin de détruire la pepsine. Le produit est ensuite filtré sur un linge, puis sur un papier Chardin mouillé pour retenir les graisses.

La peptone liquide ainsi obtenue est mélangée à la décoction de viande de veau (500 gr. par litre) préparée à part. Le bouillon est ajusté au pH choisi par addition de lessive de soude. La précipitation se fait à 115° pendant 10 minutes à l'autoclave. On filtre à nouveau sur papier. Le pH définitif est alors noté. On répartit le bouillon dans les vases de culture et la stérilisation se fait à 110° pendant vingt minutes.

Ces expériences nous ont fourni les résultats qui sont consignés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU V

Composition du milieu					
Durée de la digestion	Hydrolyse de panse de poro (325 gr. p. 1.000 d'eau)	Macération de viande de veau (500 gr. pour 1.000 gr. d'eau)	Dose-test hémolytique	Dose minima mortelle (lapin voie intra-veineuse)	N° d'ordre de la toxine
2 h.	1 partie	1 partie	0 cc. 09	0 cc. 1	74
3 h.	1 partie	1 partie	0 cc. 20	0 cc. 5	39
3 h.	2 parties	1 partie	0 cc. 15	0 cc. 25	40
6 h.	1 partie	1 partie	0 cc. 27	0 cc. 5	44
6 h.	2 parties	1 partie	0 cc. 21	0 cc. 5	41
20 h.	1 partie	1 partie	0 cc. 28	0 cc. 5	35
20 h.	3 parties	1 partie	0 cc. 28	0 cc. 5	37
24 h.	3 parties	1 partie	0 cc. 30	1 cc.	30

Le staphylocoque ne peut sécréter de toxine en l'absence de peptone. Mais il est inutile et même défavorable de continuer longtemps la digestion pep-

sique : ce sont des produits peu dégradés à partir desquels le staphylocoque élabore la toxine. Il s'oppose en cela au b. diphtérique qui produit la meilleure toxine avec les produits de digestion de panse de 24 heures et davantage, comme l'ont montré Loiseau et Philippe.

En second lieu, ce sont des quantités égales de peptone liquide et de macération de viande qui nous ont donné les résultats les meilleurs. Mais cette seconde constatation nous paraît beaucoup moins importante : l'individualité de chaque souche joue ici un grand rôle puisqu Nélis et, nous le verrons, Gengou obtenaient des toxines très actives en peptone sans macération.

Ultérieurement nos résultats furent améliorés par l'emploi de macération de viande de veau laissée 24 heures à la glacière, au lieu de décoction, et par la stérilisation par tyndallisation à 100° au lieu de chauffer à l'autoclave à 110°.

Enfin signalons qu'une peptone sèche du commerce nous a donné des résultats sensiblement égaux à ceux que nous avons obtenus avec la digestion de panse de deux heures. D'autres peptones sèches de six marques différentes ont donné des résultats inégaux.

Dans le milieu à la panse de porc, on obtient une toxine d'activité constante. Dans les autres milieux, la qualité de la toxine est plus irrégulière.

Parmi les produits de dégradation des albumines qui sont nécessaires au staphylocoque pour élaborer

la toxine, Gengou [82] a insisté sur le rôle des *acides aminés*. Cet auteur remarque que certaines souches produisent la toxine en macération de viande seule, d'autres en eau peptonée seule. Les souches de ce dernier groupe, pense-t-il, n'auraient pas une activité diastasique suffisante pour dégrader les albumines complexes que renferme la macération de viande. Il faut leur donner pour milieu nutritif des albumines déjà dégradées contenues dans les solutions de peptone. Aussi Gengou imagine de mettre ces souches en culture dans la macération de viande non fermentée, additionnée d'un acide aminé. Parmi les acides aminés dont il a fait l'essai, Gengou distingue l'arginine et l'ornithine comme seules capables de favoriser la production de toxine. Cette production croît avec la concentration de l'acide aminé dans le bouillon, jusqu'à un taux optimum de 5 0/00.

Pour les souches du premier groupe, capables de libérer semble-t-il les acides aminés à partir de la macération de viande sans peptone, l'arginine accentue la production de toxine. Elle a aussi le pouvoir remarquable de permettre l'apparition de toxine dès les premières heures de la culture, alors que dans les milieux habituels la toxine n'apparaît qu'après un délai de deux à quatre jours.

Mais ces souches subissent aussi l'influence favorisante d'un grand nombre d'autres acides aminés. Ce sont, par ordre d'activité :

— parmi les acides mono-aminés : le glyocolle, la d-alanine, la d-l-sérine, la taurine, l'acide d-glutamique ;

— parmi les acides di-aminés : la d-ornithine, la d-arginine ;

— parmi les acides à noyau benzénique ou hétéro-cyclique : la d-proline, la d-oxyproline, la d-l-phénylalanine, la l-histidine.

La production de toxine par le staphylocoque est donc liée à l'utilisation des matières protéiques dégradées, libres dans le milieu, ou libérées par certaines souches.

Cette libération peut être effectuée par d'autres microbes que le staphylocoque.

Nous pouvons rapprocher de ces faits des essais personnels au cours desquels nous avons obtenu la production de toxine en macération de viande où avait cultivé pendant 18 à 24 heures le bacille du côlon. Cette culture filtrée puisensemencée avec le staphylocoque donnait une toxine active ; au contraire, la même macération de viande, sans culture préalable de b. du côlon, ne donnait pas de toxine quand on y cultivait nos souches de staphylocoques.

CHAPITRE V

Rôle du pH

Le pH auquel il convient d'ajuster les milieux pour la formation de toxine staphylococcique n'est pas l'objet d'un accord unanime. Walbum [233] a établi l'action destructrice d'une forte alcalinité sur la toxine staphylococcique. Lui-même et Burnet après lui, recommandent un pH de 6,0. Nélis [148] recommande un pH de 7,0. Ramon [195] déclarant en 1933 utiliser le même bouillon que pour la production de toxine diphtérique (mais dépourvu d'acétate de sodium), si l'on se reporte à la publication citée [183] on voit que le pH de ce milieu est de 8,0. En 1936 il préconisait le pH de 7,5.

Rappelons d'ailleurs l'opinion de Burnet, selon lequel la majorité des staphylocoques et notamment les staphylocoques dorés sont tolérants à de grandes variations du pH du milieu. Pour lui, seul le pH intracellulaire serait important et c'est le CO_2 qui en assurerait l'acidité. Seules quelques races blanches, dont la membrane cellulaire serait perméable aux ions, exigeraient un pH strict, au voisinage de 6,8 et par là même pourraient se passer de l'action du CO_2 .

Toutefois ces divergences d'opinion nous ont incité à étudier :

1° Quel était le meilleur pH de départ pour un milieu liquide tel que le milieu de Nélis ;

2° Quelles étaient les variations du pH au cours de la culture ;

3° Quelle était l'influence du CO_2 sur le pH des cultures.

Nos résultats ont été précédemment publiés en résumé [212].

Toutes les cultures qui ont servi à ces expériences ont été faites avec un même bouillon et une même souche. Elles étaient arrêtées au bout de neuf jours, filtrées et examinées en ce qui concerne leur pouvoir hémolytique.

En premier lieu nous avons fait varier le pH du milieu avant ensemencement et pratiqué des cultures sans CO_2 .

Dans un milieu fortement alcalin, la production de toxine nous a paru faible ou négligeable. Le pH terminal est égal ou inférieur au pH initial. C'est ainsi qu'un bouillon de pH 8,4 donne après culture et filtration une toxine de pH 7,6, dont la dose minima hémolytique est de 1/150.

Dans un milieu voisin de la neutralité (pH 7,1) la culture provoque une alcalinisation : le pH terminal est de 7,8. La dose minima hémolytique est de 1/10.

Pour des milieux de plus en plus acides (pH 6,8, 6,6, 6,4 et 6,2) l'alcalinisation ne fait jamais défaut

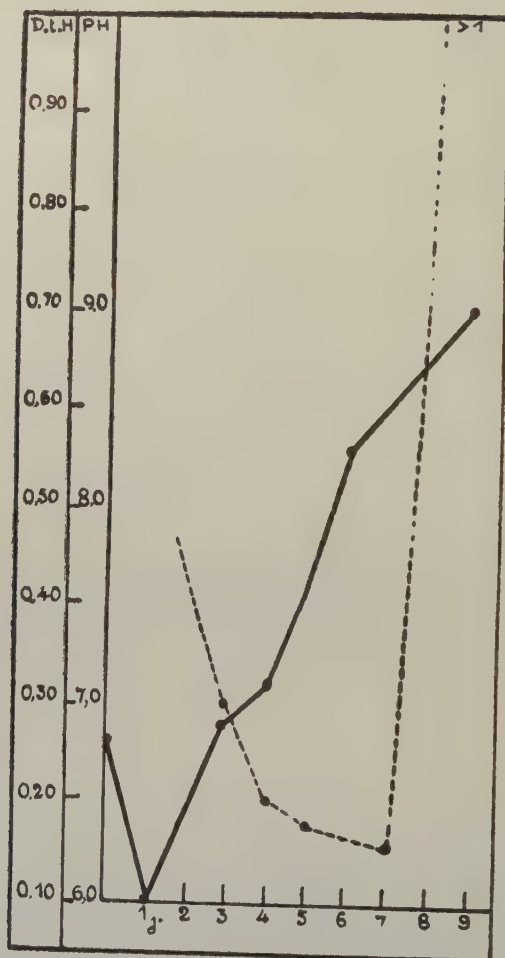


FIG. 1.

Souche : Wood.

$\text{CO}^2=0$.

et le pH terminal est de 7,6 ou 7,8 après 9 jours. Dans toutes ces cultures la production de toxine était négligeable et le pH de départ, si bas soit-il, ne permet pas l'apparition de toxine.

Dans une seconde série d'expériences nous avons suivi jour par jour les variations du pH. Les courbes que nous avons obtenues sont exactement comparables à celles de Walbum [233]. Il se produit une chute brutale du pH dès le début de la culture, suivie d'un relèvement à partir du troisième jour.

Plus le pH initial est bas, plus la chute initiale est faible ; mais cela est sans influence sur le relèvement ultérieur du pH et on ne saurait espérer limiter l'alcalinisation des milieux en recourant à une réaction très acide au départ. De plus, les courbes sont les mêmes, qu'il y ait ou non production de toxine. Nous en donnerons pour exemple la courbe ci-contre obtenue par cultures de la souche Wood toxigène en l'absence de CO_2 . On y verra nettement que « tandis que l'alcalinité de la culture augmente progressivement, la teneur en toxine passe par un maximum pour diminuer ensuite au moment où l'alcalinité est particulièrement marquée » (Gengou).

Mais l'emploi du CO_2 supprime-t-il cette alcalinisation des milieux, en agissant comme tampon ? Les souches qui exigent le CO_2 pour produire la toxine ont-elles besoin de ce gaz en tant que stabilisateur du pH ? Il ne le semble pas : le CO_2 n'annule pas les variations du pH et en particulier est sans action sur l'acidification initiale.

Des bouillons à 6,2 et 6,6 au départ ont regagné la zone alcaline après 9 jours de culture sous CO². Un milieu à 7,2 est resté sensiblement au même pH. Tous contiennent des quantités importantes de toxine (D. M. H. 1/2.000). Sans doute sur le tableau ci-dessous les pH terminaux des cultures sous CO² sont un peu moins élevés que les autres ; la différence est peu marquée et pourtant seules ces cultures sont toxigènes.

TABLEAU VI

	pH initial du milieu	pH terminal après 9 jours	Dose minima hémolytique
Cultures avec CO ² .	6,2	7,2	1/2000
	6,6	7,3	1/2000
	7,2	7,4	1/2000
	8,4	7,6	1/10
Cultures sans CO ² .	6,2	7,6	1/100
	6,6	7,6	1/100
	6,8	7,7	1/100
	7,1	7,7	1/100

L'absence de production de toxine nous a paru constante dans les milieux d'un pH supérieur à 8.

Nous pouvons donc conclure de ces essais que :

1° Un milieu de réaction acide au départ est préférable à un milieu alcalin, et *nous avons adopté un pH de 6,8 pour nos milieux de culture destinés à la production de la toxine.*

2° Les filtrats activement hémolytiques ont des pH variant de 6,8 à 7,4, c'est-à-dire sont groupés au voisinage de la neutralité à la fin de la culture.

3° Le CO_2 modère certainement mais faiblement les variations du pH au cours de la culture.

CHAPITRE VI

Rôle du glucose

Plusieurs auteurs ont proposé d'ajouter aux milieux de culture destinés à la production de toxine, différents hydrates de carbone : le maltose, la mannite, le glucose surtout. La glycérine a été recommandée par Bigger [10] comme modérateur de la réaction alcaline au cours de la culture.

Il est certain que les hydrates de carbone et la glycérine sont attaqués par presque tous les staphylocoques. La réaction acide qui s'ensuit est en effet de nature à combattre l'alcalinisation secondaire des cultures. Nélis a été l'un des plus marquants défenseurs de ce procédé, que Nicolle et Cesari [165] avaient employé en 1914. Nélis constate que les toxines qu'il obtient sont quatre fois plus actives avec l'emploi de glucose. Le taux optimum est de 1 gr. de glucose pour 1 litre de bouillon, d'après ses expériences.

Ramon, après avoir conseillé l'emploi du glucose, semble l'avoir abandonné par la suite.

Nos propres expériences ne nous ont pas montré

d'avantage à introduire le glucose dans les milieux. Les toxines produites ne se sont pas montrées plus actives. Quant à la réaction du milieu elle est profondément troublée. Dans l'ensemble l'adjonction de glucose donne un pH moins élevé au neuvième jour

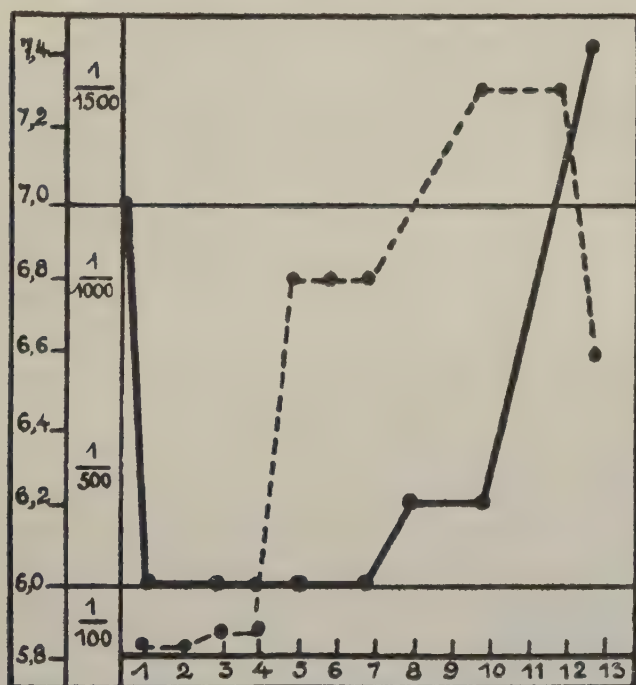


FIG. 2.

Souche : Barbier 11.

Bouillon glucosé à 1 p. 1000.

Valeur de la toxine exprimée par la dose minima hémolytique.

que celui des milieux non glucosés.

Mais si l'on note de jour en jour le pH d'un tel milieu au cours de la culture, il est aisé de voir que la

période d'acidification se prolonge plus longtemps que dans les milieux non glucosés. Elle est suivie d'un relèvement d'autant plus brusque du pH qui survient une fois la consommation de glucose achevée (fig. 2).

Selon la quantité de glucose contenue dans le milieu, et la date où la culture est interrompue, la réaction du milieu sera donc très variable, ce qui explique sans doute *la valeur irrégulière des toxines obtenues en milieux glucosés*. Nous en avons rejeté l'emploi.

Rôle des sels tampons

La destruction de la toxine par l'alcalinisation secondaire des cultures a incité nombre d'auteurs à incorporer aux bouillons des solutions de sels amphotères ou sels tampons. Comme l'a montré Sørensen la présence de ces sels tend à s'opposer aux variations de pH du milieu. Walbum [233] a étudié l'emploi de deux sels tampons (K_2HPO_4 et KH_2PO_4) dont le mélange en proportions variables permet d'obtenir des solutions tamponnées à des pH échelonnés. Il a montré que ces sels avaient peu d'action sur l'acidification initiale des cultures de staphylocoques, mais s'opposaient à l'alcalinisation secondaire. Toutefois, pour agir efficacement, ces sels doivent être présents dans les milieux à la concentration très importante de 12 grammes par litre. La croissance microbienne n'est pas entravée dans ces conditions, mais la production de lysine est à peu

près annihilée, si bien que Walbum déconseille l'emploi de milieux tamponnés avec les phosphates.

D'après Burnet [28], les phosphates ne généraient pas la production de toxine mais seulement les réactions d'hémolyse par lesquelles la toxine manifeste une de ses propriétés majeures.

L. Holm [108], Parker [174] utilisent les phosphates comme tampons.

Ramon [184] utilise le tartrate de sodium à la dose de 12 gr. par litre de bouillon.

Nous-même n'avons pas observé avec les bouillons tamponnés une véritable constance du pH après le cinquième ou sixième jour de culture. Comme d'autre part la qualité de la toxine produite n'était pas supérieure à celle des milieux non tamponnés, nous en avons abandonné l'emploi.

D'autres sels, sans jouer le rôle de tampons, ont été introduits dans les milieux de culture. Walbum insiste sur l'effet favorisant du sulfate de magnésie à la dose de 0,2 gr. par litre.

Quant au chlorure de sodium, qui est habituellement incorporé à raison de 5 gr. par litre dans les milieux usuels en bactériologie, son action semble nocive pour la production de toxine staphylococcique, au delà de 1 gr. pour 1.000 de bouillon. Aussi n'avons-nous jamais ajouté de chlorure de sodium dans nos milieux en plus de la quantité qui s'y trouve naturellement et provient de la chair musculaire des macérations ou décoctions.

Durée de la culture

Puisque l'alcalinisation secondaire des cultures altère la toxine produite, il est très important de définir la durée optima des cultures.

Burnet et à sa suite tous les expérimentateurs anglais ou américains ainsi que la plupart des auteurs allemands interrompent les cultures très précocement au 3^e ou 5^e jour. Nélis, Ramon, les laissent se poursuivre pendant 7, 10 ou 11 jours.

L'apparition de l'hémolysine dans les cultures a lieu en général dès le 2^e jour, ou le 3^e jour. Elle atteint un premier seuil déjà élevé vers le 5^e jour. Mais il nous est apparu qu'un nouvel enrichissement en toxine survenait vers le 8^e ou 9^e jour. Ce n'est qu'après le 10^e jour que le taux de toxine diminue. Si bien qu'il semble avantageux de ne filtrer ou centrifuger les toxines que vers le 9^e jour.

Mais il est certain qu'à cette date les produits d'autolyse microbienne sont extrêmement abondants dans les filtrats, ce qui n'est pas sans présenter d'inconvénients si l'on veut expérimenter ce produit par injections intra-dermiques à l'animal ou à l'homme, ou bien si l'on veut l'utiliser pour immuniser des animaux. On peut alors observer soit des réactions cutanées, soit l'apparition d'anticorps qui ne sont pas dues spécifiquement à la toxine mais répondent aux protéines microbiennes qui accompagnent cette toxine.

De plus, la rapidité d'élaboration de la toxine varie avec les souches de staphylocoques.

On ne saurait donc donner de règle stricte concernant le temps de culture. C'est affaire de tâtonnements en ce qui concerne la souche productrice; c'est affaire de convenance en ce qui concerne l'utilisation projetée de la toxine produite.

Dans la majorité des cas nous avons utilisé des cultures de neuf jours.

Cultures itératives

Après le dixième jour, une culture de staphylocoques s'appauvrit en toxine alors qu'elle ne cesse de s'enrichir en produits d'autolyse microbienne. Nous avons tenté de cultiver des staphylocoques toxigènes dans des filtrats de culture déjà toxiques, avec l'espoir d'accroître cette toxicité. Nous donnerons à ces cultures répétées plusieurs fois dans un même bouillon, le nom de cultures itératives. Cette tentative se heurtait à la notion « *d'anti-virus* » dont l'importance a été mise en lumière par Besredka. Sans doute, l'antivirus est différent de la toxine puisqu'il résiste à une température de 100° et n'est connu pour provoquer aucune lésion nécrosante si on l'injecte sous la peau. Mais rien ne permettait de penser que l'antivirus fut absent des cultures toxiques, c'est-à-dire que des cultures itératives fussent possibles dans un même bouillon, toxique ou non.

Or ces cultures furent possibles et même souvent d'abondance normale. La seconde culture fut faite d'abord à 20° pour éviter l'action de la chaleur de

l'étuve (37°) sur la toxine déjà formée dans la culture originelle. Les résultats furent négligeables.

Faite à 37°, au contraire, même en l'absence de CO₂, la seconde culture déterminait un accroissement notable de la valeur toxique du filtrat. La présence de CO₂ lors de la première et de la seconde culture donnait les meilleurs résultats et permettait d'obtenir un filtrat quatre à cinq fois plus actif que par la méthode ordinaire. On peut s'en rendre compte par l'examen du tableau VII ci-dessous.

TABLEAU VII

Accroissement de la toxicité par culture dans un filtrat staphylococcique déjà toxique

Conditions de culture		D. H. M. (gl. Lapin)	D. M. M.		
Température	Co ₂		Cobaye I.C.	Lapin I.V	
37°	+	1/1000	1/120 cc.	0 cc. 25	Exp. I
37°	—	1/500	1/120 cc.	0 cc. 25	
20°	—	1/500	1/80 cc.	1 cc.	
Toxine originelle		1/200	1/80 cc.	1 cc.	
37°	+	1/2000	1/120 cc.	0 cc. 20	Exp. II
Toxine originelle		1/1000	1/20 cc.		
37°	+	1/2000	1/120 cc.	0 cc. 20	Exp. III
Toxine originelle		1/1000	1/20 cc.		
37°	+	1/2000	1/80 cc.	0 cc. 5	
Toxine originelle		1/2000	1/80 cc.	0 cc. 5	Exp. IV

Mais dans toutes ces expériences les filtrats que nous enrichissions par une seconde culture étaient des filtrats peu toxiques.

Nous avons tenté alors d'enrichir des filtrats déjà très toxiques : il fut évident que le gain acquis par une seconde culture est d'autant plus minime que la première culture a fourni une meilleure toxine. A partir d'un certain taux de toxicité originelle (dose minimaⁿ hémolytique = 1/2000) toute culture itérative dans le même bouillon est maigre et ne produit pas de nouvelles quantités de toxine. Un exemple en est donné par l'expérience IV du tableau VII.

La question restait d'ailleurs entière de savoir si la difficulté de cultiver le staphylocoque plusieurs fois dans un même bouillon tient à la sécrétion d'une substance empêchante ou à l'épuisement des substances nutritives du milieu.

Cultures en sac de cellophane

Il paraît avantageux de fournir aux germes en culture une grande quantité de bouillon nutritif mais il serait aussi avantageux que la toxine produite ne diffusât que dans une quantité restreinte de liquide. Pour concilier cette antinomie, Gildemeister [83 *bis*] a imaginé de faire des cultures en bouillon à l'intérieur d'un sac ou boyau de cellophane plongé dans un volume de bouillon dix fois supérieur à celui qui est contenu dans le sac. La cellophane est un dérivé de la cellulose obtenu à partir de la viscose. Sous de faibles épaisseurs elle possède un pouvoir dialysant que Gildemeister définit en ces termes : « imperméable pour les bactéries, les bactériophages et l'hémoglobine, elle laisse passer par contre les solutions co-

lorantes, les pigments microbiens, et aussi les toxines dans une moindre proportion ». On pouvait donc espérer que la cellophane laisserait passer les substances nutritives vers l'intérieur du sac et retiendrait jusqu'à un certain point les produits toxiques formés. Il s'en suivrait une toxicité plus grande des cultures microbiennes faites à l'intérieur d'un tel sac.

A l'instigation de Gildemeister, cette hypothèse a conduit Grillo à tenter l'obtention de toxine dysentérique par cette méthode. Il déclare avoir pleinement réussi et obtenir des toxines dont la dose minima mortelle est de 1/1200, tandis que les chiffres habituels sont de 1/100 à 1/150 pour des cultures faites dans des flacons de Fernbach.

Nous n'avons pu nous procurer les boyaux de cellophane en Allemagne, par suite de conventions commerciales de la firme qui les fabrique et nous ne sommes pas sûrs d'avoir expérimenté avec la même qualité de cellophane que Gildemeister et Grillo. Avec une cellophane de provenance française nous avons observé à plusieurs reprises le passage des germes de l'intérieur du sac dans le milieu extérieur. De plus, nos souches n'élaboraient une toxine active qu'en présence de CO_2 . Il fallait donc modifier la technique de Gildemeister pour que le liquide de culture fût en large contact avec l'atmosphère de CO_2 . Abandonnant les boyaux de cellophane, nous avons eu recours à une membrane de cellophane que nous avons montée selon le dispositif ci-contre (fig. 3).

Après de très nombreuses semaines de recherches et de modifications, nous avons dû constater que cette méthode ne nous permettait d'améliorer la production de toxine. En d'autres mains, pourtant, il

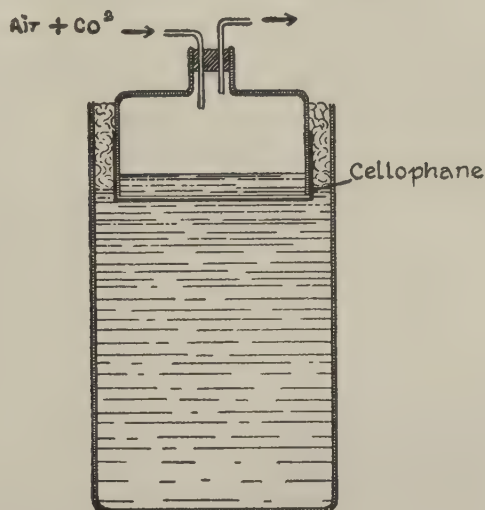


FIG. 3.

n'en est pas de même. Nous avons abandonné ces expériences lorsqu'en 1935 Seiffert [214] dit incidemment au cours d'une publication sur la toxine staphylococcique que le « procédé des sacs de cellophane accroît la valeur de la toxine d'environ 10 fois ». Mais il n'indique ni technique, ni chiffre de la valeur des toxines produites.

La méthode qui nous a donné les meilleurs résultats reste donc la culture en fioles de Fernbach, dans une faible épaisseur de bouillon nutritif.

Filtration — Centrifugation — Conservation

Après que s'est écoulé le temps de culture choisi, il faut séparer les microbes du milieu. Nous avons vu que les milieux solides étaient lavés à l'eau physiologiques et que l'émulsion microbienne était ensuite centrifugée. Pour les milieux demi-mous, cette centrifugation est précédée d'une infiltration sur gaze et sur papier.

Pour les milieux liquides qui sont les plus communément employés deux procédés de séparation des microbes et de la toxine se proposent : la centrifugation et la filtration sur bougie.

Il est certain que la centrifugation respecte mieux la toxine que la filtration sur bougie. Mais il faut une centrifugation prolongée et rapide, ce qui est difficile à réaliser quand on veut traiter des quantités de culture dépassant 100 ou 200 cc. La sécurité de la centrifugation n'est pas absolue et la plupart des auteurs qui l'emploient recommandent l'addition à la toxine d'un agent bactériostatique ou antiseptique faible (colorant : violet de gentiane Burnet [30]) pour éviter la pullulation des germes qui pourraient rester dans le liquide surnageant.

La plupart des auteurs allemands, belges, français emploient la *filtration* sur filtre Seitz, sur bougie Berckfeld ou sur bougie Chamberland L 3. Il faut auparavant dégrossir le liquide de culture sur filtre de papier préparé avec un lait de terre d'infusoires.

La baisse d'activité de la toxine après passage sur

bougie L 3 est constante. Courmont [45] l'avait déjà notée en 1894. Elle nous a paru assez peu importante et nous donnerons pour exemple notre toxine 84 dont la dose test hémolytique était de 0 cc. 09 avant filtration et de 0 cc. 12 après filtration. Cette diminution du pouvoir toxique varie d'ailleurs avec la souche utilisée et plus encore avec la composition du bouillon de culture.

La conservation de la toxine se fera à la glacière. De petites quantités peuvent être conservées en ampoules scellées. Pour des quantités de 40 à 50 cc. Nous nous sommes servis de tubes de 22 mm. de diamètre bouchés au coton cardé et capuchonnés. Plusieurs auteurs recommandent de recouvrir la toxine d'une couche de toluène ou d'huile de vaseline pour l'isoler de l'air. Panton et Valentine [169], Gengou [83] ajoutent un peu de chloroforme comme agent bactériostatique.

Nous étudierons, après les propriétés de la toxine, les modifications que lui fait subir le vieillissement.

DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE

CARACTÈRES GÉNÉRAUX

La toxine staphylococcique obtenue à partir de milieux liquides tels que ceux dont nous avons étudié l'emploi dans la première partie de ce travail, a un aspect sensiblement identique à celui du bouillon de culture. Pourtant les bouillons de coloration peu intense permettent de se rendre compte d'une légère augmentation de la teinte jaune due au pigment du staphylocoque.

L'odeur de la toxine staphylococcique est très particulière et nous avons rarement observé de culture présentant cette odeur sans être douée d'un pouvoir toxique.

Trois propriétés des filtrats doivent être mises hors de pair, ce sont le *pouvoir lytique*, le *pouvoir nécrosant* et le *pouvoir mortel*.

CHAPITRE PREMIER

Pouvoir lytique

Parmi les cellules des différents tissus, *les globules rouges* sont les éléments dont il est le plus facile d'observer la lyse par les filtrats de cultures de staphylocoques. Dès 1894, V. de Velde [229] a signalé ce pouvoir hémolytique, Neisser et Wechsberg [146] l'ont décrit comme s'exerçant de préférence sur *les globules de lapin*. Cela est vrai pour la majorité des toxines staphylococciques. L'hémolyse se produit alors le mieux à la température de 37° et atteint son maximum en moins de deux heures. Mais dans certains cas on observe une hémolyse beaucoup plus accentuée lorsqu'on retire les mélanges de l'étuve après un temps d'incubation d'une heure et qu'on les porte ensuite à la glacière. Ce phénomène auquel Bigger Boland et O'Meara [11] ont donné le nom de « Hot-cold lysis » avait été signalé par Walbum [213] comme se produisant fréquemment avec les globules de chèvre.

Il n'en va pas moins que l'hémolyse à l'étuve des globules de lapin est la plus constante. Elle présente un rapport certain (bien qu'assez lâche) avec les

autres propriétés de la toxine ; aussi est-ce un procédé de dosage qui est couramment employé.

L'emploi d'une suspension de globules dans une solution isotonique tamponnée est préconisée par plusieurs auteurs. Bien plus importante est la précaution de ne saigner, pour obtenir les globules que des lapins n'ayant pas d'antitoxine dans le sang (moins de 0,10 unité internationale par centimètre cube), et d'utiliser des suspensions préparées le jour même. — Dans les publications anglaises, l'activité des toxines est généralement exprimée par la plus petite quantité de toxine capable de produire une hémolyse de 50 % sur une suspension de globules de lapin. La lecture des expériences est rendue bien plus difficile par la nécessité d'apprécier cette hémolyse partielle. Avec Nélis [147] et pour les raisons qu'en donne très clairement Ramon [196], il est préférable d'observer pour les titrages *l'hémolyse complète* des globules : « l'hémolyse partielle est très difficile à discerner, il peut en résulter des différences d'appréciation considérables, pouvant faire attribuer, par un observateur, un pouvoir hémolytique double, triple et même quadruple de celui que lui reconnaît un autre observateur : ainsi une même toxine dosée par différents expérimentateurs aura un pouvoir hémolytique égal à 1/1000 pour les uns, à 1/2000, à 1/4000 pour d'autres ».

Voici comment on procède :

On prépare une échelle de dilutions croissantes de toxine dans l'eau physiologique, de 1/10 à 1/5000 ou

au delà. On porte dans des tubes à hémolyse 2 cc. de chacune de ces dilutions. On ajoute dans chaque tube une goutte de globules de lapin lavés trois fois et dilués à 1/3 dans l'eau physiologique. On agite. Les tubes sont portés à l'étuve à 37°, agités après une demi-heure puis après une heure. On les retire alors de l'étuve pour les porter à la température du laboratoire. Une heure plus tard, on fait la lecture des résultats.

Dans ces conditions, on exprime l'activité d'une toxine par le taux de la dilution la plus faible qui provoque l'hémolyse totale des globules de lapin. Une toxine active possède généralement une *dose minima hémolytique* de 1/2.000 et jusqu'à 1/20.000, comme l'a obtenu H. Bonnet [14] avec une souche isolée par Nélis.

Les *globules de mouton* sont beaucoup moins sensibles à la toxine staphylococcique que les globules de lapin. Avec eux, la lyse se fait lentement et n'est que rarement parvenue à son terme en deux heures. Elle ne s'arrête pas franchement à un taux donné mais la réaction s'étend sur un grand nombre de tubes, où l'hémolyse reste partielle. Il s'ensuit que les réactions sont difficiles à interpréter.

De plus, c'est avec les globules de mouton que la « hot-cold lysis » est la plus fréquente. On ne peut donc connaître l'activité vraie des filtrats sur les globules de mouton qu'en mettant les mélanges une heure à 37° et 20 heures à la glacière.

Il est courant d'observer des toxines qui lysent les

globules de lapin au 1/2.000 et les globules de mouton au 1/10 seulement. Mais quand on recherche le pouvoir hémolytique d'une série de toxines provenant de souches différentes vis-à-vis de plusieurs sortes de globules animaux on constate qu'il est impossible d'établir une hiérarchie dans la sensibilité des différents globules. Telle toxine lysera les globules de lapin à une dilution 100 fois plus forte que les globules de mouton ; telle autre lysera les deux variétés de globules à des dilutions sensiblement égales.

Il ne s'agit donc pas seulement d'une fragilité différente des différents globules, mais de la présence, en quantité variable dans les filtrats, de substances agissant électivement sur les globules de lapin (toxine α) ou sur les globules de mouton (toxine β) (Glenny et Stevens [86]).

Ces mêmes différences d'action se retrouvent si l'on étudie une série de filtrats provenant d'une même souche de staphylocoques : la dose minima hémolytique pour les globules de lapin n'est pas un multiple fixe de la dose minima hémolytique pour les globules de mouton. S'il s'agit de substances diverses entrant dans la composition des filtrats, une même souche de staphylocoques ne produit pas constamment ces substances. Elle produira tantôt plus, tantôt moins de lysine active sur les globules de mouton ou sur les globules de lapin. Nous pensons que ces variations qualitatives des produits toxiques des staphylocoques sont influencées par la composition du milieu de culture, autant que par l'individualité des

souches. L'influence des milieux ne s'exerce pas uniquement sur la quantité de toxine produite. Elle s'exerce aussi sur la qualité des filtrats et notamment peut faire varier leur activité sur les différentes variétés de globules rouges animaux.

Nous en donnons pour preuve le tableau suivant. Des expériences ont été faites avec une seule souche (n° 16) mise en culture dans des milieux qui différaient seulement par la variété de peptone industrielle : peptones de fibrine, de caséine, de viande, fabriquées récemment ou vieilles de plusieurs années, et provenant de marques commerciales différentes. Tous ces milieux contenaient 20 grammes de peptone par litre. Ils étaient au même pH. La durée de culture fut de 9 jours.

TABLEAU VIII

N° des toxines	Dose-test hémolytique		
	(1 h. à l'étuve, 1 h. au laboratoire)	après 1 heure à l'étuve	après 1 heure à l'étuve et 1 heure à la glacière
	Globules de lapin	Globules de mouton	
53	0 cc. 4	0 cc. 5	0 cc. 4
54	0 cc. 4	0 cc. 6	0 cc. 6
55	0 cc. 2	0 cc. 8	0 cc. 2
57	0 cc. 8	>1 cc.	>1 cc.
58	0 cc. 4	0 cc. 9	0 cc. 2
59	>1 cc.	>1 cc.	0 cc. 8
60	0 cc. 5	0 cc. 8	0 cc. 2
65	>1 cc.	>1 cc.	>1 cc.
66	0 cc. 2	0 cc. 3	0 cc. 3
67	0 cc. 8	>1 cc.	0 cc. 2

Souche N° 16.
Peptones de diverses provenances.

L'activité hémolytique des filtrats a été titrée en présence d'une dose de sérum équivalant à une unité antitoxique internationale (tableau VIII).

Il est facile de voir que cette seule souche mise en culture dans des milieux différents a produit des toxines qualitativement différentes. Le classement de ces toxines par ordre d'activité sur les globules de lapin n'est pas superposable au classement que l'on pourrait faire à l'aide des globules de mouton. De plus, le phénomène « hot-cold » apparaît très nettement pour plusieurs.

Nous n'avons pu nous rendre maître de ces variations et produire à volonté telle ou telle variété de toxine. Mais Seiffert [214] affirme qu'il est possible de donner à une même toxine toute une gamme d'activités diverses sur les différents globules animaux, en la diluant avec des solutions salines appropriées. C'est ainsi qu'il cite des sels alcalino-terreux comme inhibant, et le chlorure de potassium comme favorisant la lyse des globules de mouton. D'ailleurs, ces solutions salines produiraient les mêmes effets si l'on y versait les globules un certain temps avant de pratiquer l'hémolyse par la toxine.

Les globules de cheval, les globules humains se prêtent mal à l'hémolyse par la toxine staphylococcique. Les globules de cobaye constituent un matériel très impropre aux titrages par la méthode hémolytique, tant à cause de leur résistance à la toxine que de la variabilité du taux d'antitoxine naturelle dans le sang des cobayes (Ramon, Richou, Descazeaux [199]).

Le *mécanisme même de l'hémolyse* est obscur et très diversement interprété :

1° La toxine se fixe sur les globules qu'elle lyse : les partisans de l'unité de la toxine staphylococcique ont précisément utilisé des expériences de fixation par les globules pour montrer que l'épuisement d'un des pouvoirs de la toxine entraînait la diminution parallèle, ou la perte de ses autres pouvoirs (Gengou [73], Nélis [160]).

2° La toxine se fixe sur les globules en quantité plus grande qu'il n'est nécessaire pour les lyser.

On calcule la dose minima hémolytique d'une toxine pour les globules de lapin. A un volume donné d'émulsion globulaire, on ajoute une quantité de toxine 3 ou 5 fois supérieure à celle qui serait nécessaire pour provoquer la lyse. On porte le mélange à 37° pendant deux heures et la lyse se produit. Le mélange est alors centrifugé. Le liquide surnageant, rouge cerise, devrait contenir un excédent de toxine inutilisée si les globules n'avaient fixé que la quantité de toxine exactement suffisante pour les lyser. Or, ce liquide surnageant, employé pour une nouvelle expérience d'hémolyse, est reporté dans un tube, additionné d'une goutte de globules frais de lapin et porté à 37°. Aucune hémolyse ne se produit et les globules se sédimentent au fond du tube. Cette expérience donne d'ailleurs des résultats inconstants.

3° La toxine peut se fixer sur les globules d'une espèce animale sans les lyser.

On choisit une toxine lysant les globules de lapin

et sans action à l'étuve, sur les globules de mouton, même à froid. On mélange une quantité donnée de toxine avec une émulsion de globules de mouton. On porte le mélange pendant une nuit à la glacière. L'hémolyse ne se produit pas. Le lendemain on sépare par centrifugation la toxine des globules. Avec cette toxine récupérée on fait une échelle d'hémolyse à 37° en employant cette fois des globules de lapin et on constate que le contact préalable avec les globules de mouton, bien que sans phénomène apparent, a fait perdre à la toxine une proportion d'ailleurs variable de son pouvoir hémolysant sur les globules de lapin.

La fixation de la toxine serait donc indépendante de l'hémolyse proprement dite. Cette fixation se ferait à froid (10-16°) plus facilement qu'à 37°. Des globules traités à froid par la toxine peuvent être récupérés par centrifugation. Lavés à l'eau physiologique, et portés à 37°, ils lysent spontanément (Gengou [73]). De son côté, la toxine qui a servi à cette expérience se trouve épuisée par le contact avec les hématies et a perdu ses trois pouvoirs hémolytique, nécrosant et mortel.

Ainsi se trouvent démontrés, pour certains, l'hémolyse en deux temps, d'une part, et l'épuisement de la toxine, d'autre part.

Mais parmi les composants chimiques des globules rouges, quelles substances fixent ainsi la toxine ? Tous les auteurs s'accordent à exclure l'hémoglobine et à mettre en cause, vraisemblablement le stroma

globulaires. Seiffert [214] désigne plus précisément les lipoïdes des stromas, extractibles par l'alcool-éther.

Les divergences apparaissent quand il s'agit d'estimer le degré de fixation de la toxine sur ces stromas. Nélis [160] constate que les stromas provenant d'une expérience d'hémolyse et séparés par centrifugation continuent à manifester deux propriétés (hémolytique et nécrosante) de la toxine. Ils ont fixé cette toxine en excès et peuvent en céder des quantités suffisantes pour provoquer la nécrose du derme du lapin ou une nouvelle hémolyse de globules frais.

Pour A. Parker, Weld et Gunther [179], cette fixation est assez complète et assez élective pour qu'un filtrat traité par des stromas à 37° perde ses propriétés hémolysantes et mortelles pour le lapin, tout en conservant ses propriétés nécrosantes (argument important de la théorie dualiste).

Mais Forssman [70], tout en reconnaissant que l'hémolyse est précédée de fixation de la lysine, considère que cette fixation n'est qu'accessoire. Mise en contact, à la glacière, avec des globules de mouton, puis séparée après des temps variables, la lysine produit ou non le phénomène hémolytique. Dans les deux cas, on peut constater :

— Soit un épuisement de la toxine, témoignant d'une fixation.

— Soit une persistance, parfois complète, du pouvoir lytique, témoignant que la fixation puis la lyse ont été suivies d'une libération de la lysine : « phénomène unique dans nos connaissances sur les toxi-

nes bactériennes », dit Forssman, « et qui évoque une réaction de ferment ».

On voit donc que par ses propriétés hémolytiques irrégulières sur les divers globules animaux et par sa fixation capricieuse, la toxine staphylococcique n'apparaît pas comme une substance simple et de propriétés définies.

D'autres cellules que les globules rouges sont lysées par la toxine staphylococcique.

Van de Velde [229] avait montré en 1894, l'action lytique des filtrats de cultures staphylococciques sur les leucocytes, et spécialement les leucocytes du lapin. Il avait donné à la substance responsable de ce phénomène le nom de *leucocidine*. Nous discuterons dans la troisième partie de cette étude l'identité de la leucocidine avec la toxine hémolytique.

La toxine lyse les plaquettes et est fixée par elles. Gengou [78] note que la lyse des éléments du sang ne détruit pas les principes inclus dans ces éléments (cytozome des hématies, pouvoir coagulant des plaquettes, pouvoir des leucocytes de donner le phénomène de Pfeiffer sur les vibrions cholériques).

Nous verrons plus loin que la mort des animaux après injection de toxine s'accompagne de lésions de lyse cellulaire dans la plupart des parenchymes, notamment le foie et la rate.

Recherche de la dose test hémolytique

La recherche de la dose minima hémolytique donne lieu à de grandes différences d'interprétation sui-

vant les expérimentateurs. Certaines toxines manifestent des propriétés hémolytiques moins franches que d'autres. Dans une série de tubes renfermant des dilutions croissantes de toxine il est malaisé de déterminer le point-limite de l'hémolyse.

Ces difficultés d'interprétation disparaissent si l'on recherche le pouvoir hémolytique de la toxine en présence d'une quantité de sérum antitoxique, définie comme étalon. L'organisation d'hygiène de la Société des Nations a confié à P. Hartley et M. Llewellyn Smith le soin de proposer un étalon de sérum antistaphylococcique antitoxique. Après une enquête auprès de différents laboratoires en mars 1934, ces auteurs ont proposé d'adopter comme unité internationale, l'activité neutralisante spécifique (vis-à-vis de la staphylotoxine) de 0,05 milligramme d'un sérum desséché stable préparé par le « National Institute for medical Research » de Londres.

La plus petite quantité de toxine qui, en présence d'une unité internationale antitoxique, provoque l'hémolyse complète d'une goutte de globules de lapins dilués à 1/3 en une heure à 37°, puis une heure à la température du laboratoire, constitue la *dose test hémolytique* encore appelée par Ramon dose combinée hémolytique.

On procèdera à un tel dosage de la façon suivante :

On dispose d'un sérum dont le titre antitoxique est connu et a été dosé par rapport à l'étalon international. On met dans chaque tube à hémolyse d'une série de 20 tubes la quantité de sérum équivalent à une unité antitoxique. On ajoute dans chaque tube

une quantité de toxine qui augmente de 0 cc. 01 de tube en tube, par exemple, de 0 cc. 05 à 0 cc. 24. On complète chaque tube avec une solution isotonique de NaCl jusqu'au volume de 2 cc. On y ajoute aussitôt une goutte de globules de lapin lavés trois fois et dilués au 1/3. L'expérience est poursuivie comme pour la recherche de la dose minima hémolytique.

Les toxines actives hémolysent une goutte de globules de lapin à la dose de 1/1.000 de cc. ou moins, comme nous l'avons vu.

Or, dans la recherche de la dose-test, la quantité de toxine qui distingue deux tubes voisins dans l'échelle d'hémolyse est de 1/100 de cc. en plus ou en moins, soit dix fois la dose minima hémolytique. Il en résulte que dans un tube donné la toxine est exactement neutralisée et ne produit pas l'hémolyse. Dans le tube situé à la droite de celui-ci, il y a un excédent de toxine libre de 1/100 de centimètre cube : dans ce tube, la lyse est très franche.

Aussi la recherche de la dose-test hémolytique permet-elle non seulement d'exprimer des résultats comparables dans les différents laboratoires du monde entier quand on se contente d'une approximation de 0 cc. 01. Elle a aussi l'avantage de donner des réactions nettes, avec un point-limite facile à déterminer, souvent même évident 15 à 20 minutes après que les réactions ont été portées à l'étuve.

CHAPITRE II

Pouvoir nécrosant

La toxine staphylococcique provoque une nécrose des tissus vivants où elle est injectée. De toutes les propriétés de la toxine, ce pouvoir nécrosant est le reflet le plus fidèle des propriétés pathogènes des staphylocoques vivants. Le bourbillon du furoncle est le produit de la nécrose. Le fond des anthrax est constitué par une nappe de tissu nécrosé. Sur les coupes histologiques d'abcès du rein à staphylocoques, chez l'homme ou chez l'animal, il est facile d'observer autour des grains formés par l'agglomération de microbes, une aire plus ou moins étendue de nécrose. Mais cette nécrose est toujours cantonnée au voisinage des germes : l'action nécrosante du staphylocoque *in vivo* est une action locale.

L'injection sous-cutanée de toxine provoque une escarre d'importance variable, et qui peut aller jusqu'à dénuder les muscles. Selon Nicolle et Césari [165], l'aspect de l'escarre reflète l'activité de la toxine : escarre humide pour des doses fortes ou des toxines actives ; « type V » (escarre violacée sèche) pour des doses moindres ou des toxines atténuées par la chaleur.

L'importance de la nécrose est proportionnelle à l'activité de la toxine et peut servir à la mesurer. Pour cela, il est nécessaire de recourir aux injections intra-dermiques au lapin (Parker [176]) : le cobaye doit être écarté comme animal d'expérience, à cause de la variabilité du taux d'antitoxine naturelle contenue dans son sérum.

On préférera les lapins blancs comme ayant la peau la plus fine. A l'épilation manuelle ou au rasage, on préférera l'épilation par une pâte formée de sulfure de baryum bien pulvérisé et d'eau. On réservera une bande de poils sur l'échine généralement difficile à épiler. Les poils du ventre et des flancs sont d'abord coupés aux ciseaux ou à la tondeuse, puis soigneusement mouillés. On étend ensuite la pâte au sulfure de baryum avec un tampon d'ouate, sans frotter violemment. Après quelques minutes, on entraîne avec un tampon sec les poils épilés et on fait une deuxième et au besoin une troisième application de pâte. Les parties épilées sont ensuite très largement lavées à l'eau tiède. Ce n'est que le lendemain qu'on pratiquera les injections intra-dermiques. La repousse du poil ne commence généralement qu'au quatrième ou au cinquième jour après l'épilation.

Il est très important de n'utiliser pour ces expériences que des animaux neufs n'ayant pas plus de 0,05 unité internationale d'antitoxine par cc. de sang.

Les injections seront faites au centre des carrés d'un quadrillage dessiné sur la peau avec un crayon

dermographique, et distantes de 4 centimètres environ. Elles seront de 1/10 de cc. uniformément. Seul le taux des dilutions variera.

En cas de nécrose, après 24 heures, apparaît une plaque blanchâtre, légèrement œdémateuse, qui s'entoure le deuxième jour d'un liséré violacé livide. Les nécroses étendues peuvent mesurer 5 à 6 cm. de diamètre et présenter ses bords irréguliers. L'escarre est alors souvent humide et s'infecte secondairement. La dose minima nécrosante donne en général une petite plaque œdématisée de 0,5 cm. de diamètre qui est remplacée les jours suivants par une croûte noirâtre sèche de 2 mm. de diamètre environ, tombant au bout de 5 jours.

La dose minima nécrosante est en général deux à trois fois plus petite que la dose minima hémolytique. Mais ce rapport n'est pas fixe.

L'action nécrosante de la toxine peut être titrée en présence de sérum antitoxique, comme nous l'avons vu pour l'action hémolytique.

On utilise pour ces dosages un sérum antitoxique déjà titré comparativement à l'étalon international. On dépose dans une série de tubes la quantité de ce sérum équivalent à un dixième d'unité antitoxique. On ajoute des doses croissantes de la toxine à titre. Les mélanges sont injectés dans le derme épilé d'un lapin sous un volume de 0 cc. 1. La plus petite quantité de toxine qui, dans ces conditions produit la nécrose définit la dose-test intra-cutanée (Lr/10), encore appelée par Ramon dose combinée nécrosante.

La dose-test cutanée d'une toxine est habituellement 5 à 10 fois plus petite que la dose-test hémolytique. Ce rapport est d'ailleurs variable.

La répétition des injections intra-dermiques de toxine au lapin amène l'affaiblissement puis la disparition des réponses cutanées. En même temps, l'antitoxine spécifique apparaît et s'accroît dans le sang. Mais à l'opposé de cette vaccination qui est de règle, Burky [25] a observé des cas de réponse excessive aux réinjections évoquant une sensibilisation allergique de l'animal, peut-être due aux composants du bouillon. De même Panton et Valentine [168] pensent que les injections secondes de cultures de staphylocoques dans le derme des lapins donnent une réponse du derme de caractère nettement allergique.

Les injections intra-dermiques de toxine diluée (1/1.000) à l'homme provoquent une simple rougeur au point d'injection. Debré, Bonnet, Thieffry, Sabetay [49] ont observé que cette réaction était aussi marquée, ou même plus marquée, chez des individus qui possèdent un taux notable d'antitoxine staphylococcique dans le sang. Ils pensent que cette réaction n'est pas atténuée quantitativement par l'antitoxine circulante, mais qu'il s'agit d'un phénomène de sensibilité ou d'allergie.

Les mêmes auteurs [17 *bis*] ont pratiqué des injections intra-dermiques de toxine peu diluée (1/10) et ils ont constaté que les réactions allergiques cédaient le pas, dans ce cas, aux réactions dues à la toxine elle-même. Enfin l'emploi de toxines obtenues à par-

tir de cultures peu prolongées (5 jours) permet également d'éliminer la part qui est due aux protéines microbiennes dans les réponses dermiques.

Ces réactions allergiques feraient défaut quand on utilise, pour les injections intra-dermiques à l'homme, une toxine purifiée (Bocage et Mercier [12]). Dans ce cas, on n'obtient de réactions positives que chez les individus pauvres en antitoxine circulante (Carlinfanti [35]).

CHAPITRE III

Pouvoir pathogène expérimental

Il est possible de tuer la souris par injection de toxine staphylococcique, soit dans le péritoine, soit dans une veine. Mais les résultats obtenus manquent de régularité.

Un assez grand nombre d'animaux de laboratoire sont sensibles à l'injection intra-musculaire de toxine. Mais la mort tarde alors plusieurs jours et ne survient en général qu'après l'apparition d'une très vaste zone de mortification autour du point d'injection. Le rôle de l'infection secondaire et de la résorption de produits tissulaires obscurcit alors le rôle proprement toxique du produit injecté. C'est *l'injection intra-veineuse* qui est le procédé de choix pour apprécier la valeur toxique des filtrats de staphylocoques sur l'animal, et c'est *le lapin* qui est l'animal de choix pour cette étude.

On utilisera des lapins de 2.000 grammes environ. On observe alors une *mort rapide* des animaux. Elle suit immédiatement l'injection pour des doses fortes de toxine. Provoquée par la dose minima mortelle, la mort survient entre trois minutes et une demi-heure

après l'injection. Nous avons remarqué que les animaux qui survivent plus d'une demi-heure après l'injection guérissent dans la proportion de 9 sur 10 environ. Ceux qui succombent tardivement le font après un délai variable ; l'inconstance de ces résultats tardifs les rendent sans valeur pour apprécier l'activité de la toxine. Celle-ci agit donc suivant un mode « tout ou rien » bien particulier.

Après l'injection dans la veine marginale de l'oreille, l'animal offre un comportement normal pendant un temps plus ou moins long. Les premiers symptômes de l'intoxication se révèlent par l'inquiétude, une agitation modérée du lapin qui explore toute sa cage, puis par la polypnée. Quelques minutes après on voit l'animal s'affaïsser légèrement sur les pattes antérieures. Celles-ci glissent de part et d'autre de la ligne médiane et l'animal les ramasse sous lui à plusieurs reprises avec une fatigue visible et croissante. En même temps la tête n'a plus son port normal mais s'incline sur le côté et en avant. L'animal fait des efforts répétés pour la tenir droite. Puis il ne peut se soutenir et se couche sur le flanc, respirant très vite.

Tout à coup survient un brusque mouvement de détente des deux pattes postérieures qui se répète à plusieurs reprises. La tête se renverse fortement sur la nuque. L'animal cherche à fuir, se relève et va se heurter généralement à un angle de la cage. La détente simultanée des deux pattes postérieures se répète sans arrêt pendant une dizaine de secondes,

réalisant une sorte d'effort de fuite sur place. Puis survient un repos pendant lequel la respiration est suspendue. Après deux ou trois phases de ces convulsions du train postérieur, l'animal s'immobilise. Quelques inspirations forcées surviennent ; souvent l'animal crie et meurt aussitôt, la tête rejetée en arrière. Deux symptômes nous ont paru constants au moment de la mort ; l'exophtalmie considérable avec mydriase et le péristaltisme intestinal visible sous la paroi, se prolongeant quelques instants après le cri agonique, et s'accompagnant de défécation.

L'analyse physiologique des symptômes précédant la mort rapide des lapins après injection intra-veineuse de toxine a été faite par Kellaway Burnet et Williams en 1930. Ces auteurs ont observé une chute rapide transitoire de la tension artérielle, suivie d'une récupération, puis d'une chute terminale rapide, due à l'obstruction du système circulatoire pulmonaire par l'œdème. A cela s'ajoute une action toxique sur le cœur, même isolé en circulation artificielle. Nélis et J. Bouckaert [149] ont repris cette étude en 1933. Pour eux, la baisse de tension est due à une baisse de l'activité cardiaque, et l'atteinte du cœur (ou de ses centres nerveux régulateurs) précède l'atteinte des centres nerveux respiratoires. Ils considèrent l'action des filtrats staphylococciques comme neurotoxique avant tout.

A l'autopsie, les lésions sont minimales dans ces cas de mort rapide. Parfois on ne trouve rien d'anormal ; parfois existe une congestion œdémateuse pleuro-pul-

monaire. La lyse des éléments figurés du sang est inconstante et incomplète.

Il n'est pas douteux qu'une action aussi rapide comme aucune autre toxine n'en fournit d'exemple, évoque l'idée d'un choc anaphylactique. Même incubation de quelques minutes, mêmes phénomènes convulsifs, même chute de tension artérielle, même possibilité d'œdème pulmonaire, même pauvreté de constatations anatomiques, même guérison fréquente si l'animal n'a pas succombé dans un bref délai. On peut attribuer ces phénomènes de choc à la libération d'albumines dans le sang circulant, à la suite d'une hémolyse intense. Mais cette hémolyse est souvent discrète dans les cas de mort les plus rapides.

On peut aussi supposer qu'il existe une véritable sensibilisation spontanée des lapins aux produits solubles élaborés par le staphylocoque. Cette sensibilisation inapparente se ferait au cours du jeune âge de l'animal et existerait chez tous les lapins adultes. Or Le Fèvre de Arrie [125] avait signalé en 1919 que les lapins adultes étaient plus sensibles que les jeunes à l'injection intra-veineuse de toxine. Burky [24], plus tard, est allé jusqu'à dire que les lapins de quatre mois et au-dessous sont « insensibles à l'action mortelle de la toxine ». Nos propres expériences ne nous permettent pas de souscrire à une opinion aussi absolue.

On prend deux lapins adultes au hasard (lot n° 1), deux lapins de trois mois nés d'une mère en cours de vaccination antitoxique et qui possédait 2 U. d'anti-

toxine par centimètre cube de sang (lot n° 2), enfin deux lapereaux de six semaines environ, indemnes de tout contact expérimental avec le staphylocoque ou ses produits, nés d'une mère non vaccinée (lot n° 3).

Le sort de ces animaux ne fut pas très différent (tableau IX). Ils moururent de l'injection intra-veineuse de toxine. Seul un lapereau du dernier lot survécut indéfiniment ; il avait reçu une dose de toxine inférieure en valeur absolue à la dose minima mortelle d'un adulte de 2 kg., mais proportionnellement égale à cette dose calculée par kilog. d'animal.

TABLEAU IX

	Lapins	Toxine 74 I. V.	Sort des animaux
Lot N° 1	C93 = 2.000 gr.	0 cc. 1	Mort en 15 minutes.
	C97 = 2.100 gr.	0 cc. 1	Mort en 15 minutes.
Lot N° 2	B2 = 1.250 gr.	0 cc. 1	Mort en 10 minutes.
	B4 = 1.400 gr.	0 cc. 1	Mort en 30 minutes.
Lot N° 3	B5 = 750 gr.	0 cc. 20	Mort en 15 minutes.
	B6 = 825 gr.	0 cc. 05	Survie.

Il ne peut donc s'agir d'une insensibilité absolue des jeunes lapins à la toxine par voie intra-veineuse. Mais on peut concéder que les jeunes animaux sont proportionnellement plus résistants que les adultes.

Rapprochée du mode d'action de la toxine chez le lapin adulte, cette constatation fait penser que le phénomène de mort rapide comporte une part d'ac-

tion allergique. Nous avons vu que l'étude des injections intra-dermiques de toxine à l'homme oriente vers les mêmes conclusions.

La *dose minima mortelle* est donc, nous le répétons, la plus petite quantité de toxine qui entraîne la mort du lapin de 2 kilogrammes en une demi-heure, injectée par voie veineuse. Cette dose est de 0 cc. 20 à 0 cc. 10 pour les toxines actives. Elle peut atteindre 0 cc. 02 (Ramon [184]) pour des échantillons très toxiques.

Des doses plus petites tuent très inconstamment mais avec des lésions bien plus nettes. On trouve souvent dans les séreuses des exsudats séro-hémorragiques. Il existe constamment un laquage du sang dans les veines.

Les poumons sont congestifs et œdémateux. Nélis et Picard [161] ont insisté sur l'intensité de la lyse du protoplasma des cellules hépatiques avec conservation des noyaux.

Les lésions rénales sont connues depuis l'étude de Horse [110], de Neisser et Levaditi, et de Neisser et Wechsberg [146] qui les considéraient comme des infarctus. Rigdon, Joyner et Ricketts [208] les ont décrites comme des lésions de l'endothélium glomérulaire et de l'épithélium des tubes contournés. Von Glahn et Weld [85], expérimentant sur le chat, ont constaté que les lésions des capillaires des glomérules étaient les plus précoces, les plus intenses et vraiment électives. Les lésions à type d'infarctus, les lésions tubulaires et les lésions de nécrose corticale seraient secondaires.

Enfin des injections minimales et répétées de toxine sous la peau modifient la formule sanguine des lapins (Néris et Weerdt [164]). On voit survenir une polyglobulie passagère puis une anémie qui tend à être compensée par l'hyperchromie et l'apparition de réticulocytes. Les éléments blancs se multiplient avec tendance à la monocytose. La leucopénie, quand elle survient, pour des doses importantes, aurait la valeur d'une leucopénie de choc.

L'action de la toxine sur les centres nerveux a été étudiée par Travassos [218 à 221]. Cet auteur a utilisé les injections intra-cérébrales de toxine par voie transoculaire, chez le cobaye. Nous avons recouru avec le même succès à la trépanation, en faisant les injections sous volume de 1/4 de centimètre cube. Les résultats sont assez constants pour permettre d'apprécier l'activité des toxines sur un matériel animal moins onéreux que les lapins.

Après un temps variable d'incubation, l'animal présente une raideur des membres postérieurs en extension. Il se traîne quelque temps avec les pattes antérieures puis tombe sur le flanc 10 minutes à 1/2 heure après l'injection. Aussitôt commencent les convulsions. L'animal a la tête rejetée en arrière en opisthotonos extrême, l'échine bombée, les pattes antérieures rigides en extension. Les pattes postérieures sont animées d'un mouvement rapide de pédale. Les phases de convulsions cloniques alternent avec une immobilité tonique. La miction et la défécation sont constantes. Après plusieurs heures l'animal succombe.

Il est exceptionnel d'observer un animal tombé sur le flanc se relever et guérir.

La dose minima mortelle pour une toxine active est d'environ 1/120 de centimètre cube.

Nélis et Bonnet [158-159] ont réalisé des effets identiques mais plus rapides (quelques minutes) chez le lapin par injections intra-rachidiennes sous-occipitales. Ils ont alors observé que l'arrêt de la respiration précède l'arrêt du cœur, contrairement à la constatation de Nélis et Picard rapportée plus haut, à la suite d'injection intra-veineuse. Dans une expérience où fut employée la respiration artificielle, ils purent maintenir plus d'une demi-heure la survie. La mort survint par une hypotension progressive.

Enfin signalons pour compléter cette étude de l'action pathogène de la toxine sur les animaux que Nélis [156] a obtenu des paralysies de la patte postérieure du lapin en poussant une injection de toxine dans le bout périphérique de l'artère fémorale. Il nous semble d'ailleurs que cette paralysie flasque est plus d'origine circulatoire (infarctus) que d'origine nerveuse et peut être comparée aux impotences complètes des deux membres qui accompagnent l'oblitération embolique de la bifurcation aortique chez l'homme.

L'animal meurt d'intoxication ou bien survit et conserve cette impotence une dizaine de jours.

*
* *

De l'ensemble de ces faits, nous concluons que la toxine staphylococcique est douée d'un pouvoir mor-

tel incomparablement moins fort que les toxines tétanique ou diphtérique, et même que la toxine dysentérique. De plus, son action rapidement mortelle, qui manque son but quand elle n'a pas tué dans la première demi-heure, est très peu semblable à l'effet progressif des toxines précédemment connues. Celles-ci agissent après une période d'incubation. Aussi l'hypothèse d'un phénomène de choc plus que d'une action toxique véritable, est-elle plausible, pour la toxine staphylococcique.

Ses effets hémolytiques *in vitro* présentent des particularités assez confuses.

Son effet nécrosant est régulier, constant et rappelle les lésions observées au voisinage des colonies de staphylocoques dans les infections microbiennes expérimentales ou spontanées.

C'est une toxine faible, douée d'une action surtout locale.

CHAPITRE IV

Actions physiques sur la toxine

FILTRATION. — Nous avons vu que les cultures de staphylocoques perdaient environ $1/10^e$ à $1/5^e$ de leur activité par filtration sur bougie Chamberland L3.

La toxine est également filtrable à travers les membranes de collodion. Nous avons filtré une toxine trois fois successives à travers la paroi d'un sac de collodion sans diminuer son activité hémolytique.

OXYGÉNATION. — Le séjour à l'air altère rapidement la toxine. Beaucoup d'auteurs recommandent de la conserver sous une couche d'huile de paraffine ou d'huile de vaseline.

L'agitation en présence de l'air détruit les propriétés toxiques des filtrats en 2 à 6 heures à la température du laboratoire. Il apparaît dans le liquide de très fins flocculats. Cette action fait défaut si on ajoute à la toxine un volume égal d'huile de vaseline. Il se produit une émulsion imparfaite ; la centrifugation permet de récupérer la toxine non altérée (tableau X).

TABLEAU X

*Agitation en présence d'air
Pouvoir hémolytique de la toxine*

	2 cc.	1/10	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/1500
Toxine 74	+	—	—	—	—	—	—
Toxine 74 + huile de vaseline	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—

L'ACTION DE LA CHALEUR nous a donné des résultats nets et constants : la toxine est altérée à partir de 50°. Le chauffage à 55° pendant une heure détruit la toxine. Nous avons obtenu des résultats concordants avec des échantillons de valeur toxique différente comme le montrent les tableaux suivants (tableaux XI et XII).

TABLEAU XI

Expérience avec toxine 55

	D. H. M.	D. M. M. cobaye
55	1/500	1/60
55 1 h. à 50°	1/200	1/4
55 1 h. à 60°	>1/10	>1/4
55 1 h. à 70°	>1/10	>1/4
55 2 h. à 70°	>1/10	>1/4

TABLEAU XII

Expérience avec toxine 52

	D. H. M.	D. M. M. cobaye
52	1/1000	1/100
52 1 h. à 50°	1/1000	1/80
52 1 h. à 55°	>1/10	>1/4

Ces résultats concordent avec ceux de Neisser [146 bis] : « Un chauffage pendant 20 minutes à 56° détruit l'hémolysine complètement et la réactivation a été impossible jusqu'à présent ».

Pourtant de nombreux expérimentateurs ont signalé la résistance très variable de la toxine à la chaleur.

Gross [99] admet la destruction de la toxine à une température de 60°.

Bigger, Boland, O'Meara [11] disent qu'au pH 7,0 le chauffage à 60° pendant 1 h. 1/2 diminue la toxicité de moitié.

Gengou [83] signale que les toxines sont plus facilement détruites par la chaleur en milieu alcalin, mais qu'en milieu acide elles « reparaissent à 85° ou 100° ». Il ne précise pas comment se manifeste cette « réapparition ». S'agit-il des propriétés toxiques ou du pouvoir antigène ?

D'après Seiffert [214], « les épreuves de thermos-
« stabilité ont montré tous les degrés depuis la résis-
« tance partielle à 101° pendant une heure, jusqu'à la
« destruction complète à 54° pendant une heure ». Seiffert a pu régénérer par agitation une toxine qui paraissait complètement détruite à 54°. Trois fois, il a régénéré une toxine chauffée à 101°. Il observe que les toxines, même chauffées à 101°, peuvent provoquer des nécroses importantes, après addition de sels minéraux. L'addition d'eau distillée diminuerait au contraire la résistance à la chaleur.

L'action de l'air, de la température et de la lumière se combinent dans l'atténuation des toxines par *vieillessement*. Même à la glacière et dans l'obscurité, nos toxines perdent la moitié de leur activité en six mois environ. Mais cette baisse spontanée porte bien plus sur le pouvoir toxique proprement dit que sur la propriété de s'unir à l'antitoxine spécifique. En d'autres termes, on observe par vieillissement une baisse de

l'activité toxique et une conservation relative du pouvoir antigène. Il en résulte que *la recherche de la dose-test hémolytique n'est valable que pour les toxines fraîches*. Nous en donnons ci-dessous un exemple très démonstratif (tableau XIII).

TABLEAU XIII

	Dose minima hémolytique	Dose minima nécrosante	Dose minima mortelle	Dose-test hémolytique
Toxine 74				
le 10/4/36	1/3000	1/800	0 cc. 1	0 cc. 09
Toxine 74				
le 10/2/37	1/300	1/250	2 cc.	0 cc. 12 ⁽¹⁾

La *dessiccation* de la toxine liquide permettrait sa conservation parfaite et prolongée sous forme d'une poudre jaunâtre soluble dans l'eau salée physiologique (Bigger, Boland, O'Meara [11]).

Nous ne citerons que pour mémoire les expériences de *précipitation* de la toxine par l'hydroxyde d'alumine (Yato [235]), l'acide trichloracétique (Ramon, Boivin et Richou [186]), ou l'acide acétique (Burnet et Freeman [32]), méthodes de purification que nous n'avons pas expérimentées.

(1) Pour éviter toute cause d'erreur, nous avons effectué ce dosage avec une antitoxine étalon reçue très récemment de l'Institut Sérologique de Copenhague (D^r Madsen).

CHAPITRE V

Actions chimiques sur la toxine

La toxine staphylococcique fait preuve, à l'égard des actions chimiques, d'une fragilité marquée.

L'action des acides a été étudiée notamment par Nélis [148]. Les acides forts, sulfurique et chlorhydrique détruisent la toxine à peu près immédiatement à un taux de 5 pour 100 ou davantage. A une concentration de 1 pour cent on n'observe qu'une destruction partielle. A une concentration de 5 pour 1000, l'atténuation est progressive. Elle est hâtée si le mélange est porté à 37°. La destruction est complète le quatrième ou le cinquième jour.

Les acides faibles se comportent d'une façon qui n'est pas uniforme. A un taux de 5 pour 1.000 l'acide tartrique et l'acide lactique ont une action à peu près nulle. L'acide oxalique a une action faible. L'acide salicylique et l'acide benzoïque provoquent une détoxication qui est complète au bout d'une vingtaine de jours à 37°. L'acide β -oxynaphtoïque fait preuve d'une activité très marquée et amène la détoxication complète en 3 à 5 jours à 37°.

Pour toutes ces expériences il est nécessaire de ra-

mener la toxine à la neutralité, après action de l'acide.

Il est à remarquer que la destruction ou l'atténuation porte parallèlement sur les trois pouvoirs hémolytique, nécrosant et mortel, sans qu'on puisse les dissocier.

L'alcalinisation a été surtout étudiée par Walbum [233]. Portée à un pH de 8,0 ou de 5,0 la toxine perd complètement son activité en 3 jours à 40°.

L'action du formol a été étudiée par un très grand nombre d'expérimentateurs qui s'inspiraient de la découverte de Ramon concernant la toxine diphtérique et qui avaient en vue les applications thérapeutiques de l'anatoxine staphylococcique.

Nous nous sommes limité à l'étude de la toxine et nous n'exposons pas les propriétés de l'anatoxine ni du sérum antitoxique.

L'action des *lipoides* sur la toxine staphylococcique méritait une étude spéciale. On a vu (p. 69) que la lyse des globules rouges peut être attribuée à l'action de la toxine sur les stromas qui sont riches en lipoides. Cette action s'accompagne d'ailleurs irrégulièrement de perte des différents pouvoirs de la toxine. En mettant en contact à 37° la toxine et des stromas de lapin, Parker, Weld et Gunther [179] avaient réussi à fixer la lysine et la leucocidine en respectant le pouvoir nécrosant de la toxine. Enfin, Seiffert [214] avait pu épuiser la toxine par action des lipoides du sang hémolysé, séparé des stromas autant que faire se peut.

D'autre part, les symptômes de la mort rapide des lapins après injection intra-veineuse sont en grande part des symptômes nerveux. Portée au contact du cerveau par trépanation ou par voie sous-occipitale, la toxine provoque des troubles convulsifs et à dose moindre que par voie intra-veineuse. Or, le cerveau est riche en lipoides : des expériences de fixation de la toxine staphylococcique *in vitro* sur la matière cérébrale, inspirées des recherches de Marie sur la toxine tétanique, nous semblaient justifiées.

On prélève aseptiquement le cerveau d'un cobaye, on le broie au broyeur de Borrel, ou on le pulpe au mortier stérile. La bouillie cérébrale est mise en contact avec 10 à 100 doses mortelles de toxine pour le lapin. Les mélanges, émulsionnés autant que possible, et agités de temps à autre, sont portés les uns à la glacière, les autres à l'étuve à 37°. Après un temps de contact variable on sépare par centrifugation, la substance cérébrale de la toxine. Celle-ci est alors éprouvée par hémolyse sur les globules de lapin et par injection intra-cérébrale au cobaye. Des expériences-témoins étaient faites avec les mêmes toxines laissées seules à l'étuve ou à la glacière pendant un temps égal. Elles n'étaient pas sensiblement modifiées. On voit par les résultats du tableau ci-contre reproduisant deux de ces expériences, que le pouvoir hémolytique ne fut pas modifié et que le pouvoir convulsivant sur le cerveau du cobaye fut inconstamment et incomplètement atténué.

TABLEAU XIV

FIXATION DE TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE SUR CERVEAU

Expérience avec toxine staphylococcique III

	D. H. M.	D. M. M. cobaye
III	1/500	— 1/80
III		
+ cerveau		
60 h. glacière	1/500	+ 1/4
III		
+ cerveau		
3 j. glacière	1/500	1/40

Expérience avec toxine 56.

	D. H. M.	D. M. M. cobaye
56	1/200	1/80
56		
+ cerveau		
48 h. 37°	1/200	1/20
56		
+ cerveau		
3 j. 37°	1/200	1/20
56		
+ cerveau		
48 h. glacière	1/200	1/60

On ne peut conclure à la fixation de la toxine par les lipoïdes cérébraux.

Nous avons également tenté de fixer ou d'épuiser la toxine par deux *lipoïdes* de constitution chimique

définie : le cholestérol et la lécithine. Si on place sur un agitateur un récipient contenant de l'eau distillée et des billes de verre et qu'on introduise par fractions le cholestérol, on peut obtenir au bout de 24 heures, une émulsion à 1 % à condition d'introduire dans le mélange quelques gouttes d'huile pendant l'agitation. Cette émulsion laiteuse est stable et peut être tyndallisée 3 jours à 70° sans précipiter. Il est un peu plus difficile de réussir de pareilles émulsions avec la lécithine (0,5 %).

Disposant de semblables émulsions ⁽¹⁾, nous les avons mises en contact avec la toxine à raison de 5 cc. d'émulsion (soit 5 centigrammes de produit actif) pour 50 cc. de toxine. L'ensemble était laissé 24 heures à 37°. L'atténuation fut assez faible pour ne pas dépasser celle de la toxine-témoin laissée le même temps à l'étuve. L'expérience était donc négative.

Nous décidâmes de poursuivre avec l'*huile cholestérinée* (Schwartz [213]) qui contient plus de cholestérine que les suspensions en eau distillée. Nous avons été précédés dans cette voie par Balsamelli [7 et 8] qui avait noté que l'huile cholestérinée fait perdre à la toxine son pouvoir hémolytique, et que le lapin peut supporter 6 doses mortelles de toxine ainsi traitée. Balsamelli soulignait qu'un temps de contact de 24 heures était nécessaire pour cette détoxication. Les mêmes résultats étaient obtenus par

(1) Dues à l'obligeance du D^r LOMINSKI.

action de la lanoline dont on sait qu'elle contient une quantité très importante de lipoïdes indéterminés. Ces expériences rejoignent celles que Ramon et ses collaborateurs ont poursuivies en injectant aux animaux des mélanges d'antigènes (toxine ou anatoxine) diphtérique ou tétanique et de corps gras : on sait que les animaux d'expérience supportent ainsi des quantités plusieurs fois mortelles de toxine, et que l'immunité ainsi acquise est supérieure et plus rapidement acquise qu'après injection de toxine ou d'anatoxine seules.

L'huile que nous avons employée était l'huile d'œillette lavée à l'alcool. La cholestérine y était incorporée à chaud, cristallisait par refroidissement, et l'excès non dissous était éliminé par filtration. Le taux de cholestérine ainsi dissoute était de 3 % environ : le produit était parfaitement limpide (1).

Afin de réaliser un contact étroit entre la toxine à modifier et l'huile cholestérinée, nous avons eu recours à l'agitation continue. Comme l'agitation au contact de l'air suffit à atténuer et à détruire la toxine, nos mélanges étaient placés en ampoules de verre scellées à la flamme, après que le vide eût été fait à la partie supérieure. L'agitation durait un temps variable, de 2 heures à 6 heures, faite tantôt à la température du laboratoire, tantôt dans une chambre-étuve à 37°.

(1) Toutes ces préparations huileuses ont été faites par notre collègue et ami HENRY, interne en pharmacie de l'Hôpital Bretonneau, que nous remercions de ses conseils.

Après agitation les mélanges présentaient l'aspect d'une émulsion assez fine mais non stable et qui se séparait rapidement en ses produits originels. Une centrifugation rapide accélérât cette séparation : il était ainsi possible de récupérer l'huile et la toxine sans aucune déperdition. Leur aspect était le même qu'avant agitation.

On trouvera dans le tableau suivant les résultats de quelques-unes de ces expériences faites avec des quantités égales d'huile cholestérinée et de toxine.

TABLEAU XV

	Durée de l'agitation	Température	Dose minima hémolytique	Dose minima nécrosante	Dose minima mortelle Lapin	mortelle Cobaye
Toxine 56			1/200	1/400	1 cc.	1/80
Toxine 56 + huile cholestérinée	6 heures	37°	1/200	1/250		1/80
Toxine 74			1/3000	1/800	0 cc. 1	
Toxine 74 + huile cholestérinée	6 heures	37°	1/500		0 cc. 5	
Toxine 74 + huile cholestérinée	1 heure	20°	1/500		0 cc. 5	

Nos résultats étaient opposés à ceux de Balsamelli. L'huile cholestérinée dans les conditions de nos expériences ne faisait disparaître aucun des pouvoirs hémolytique, nécrosant ou mortel de la toxine.

D'où provenait cette différence ? Sans doute du taux de cholestérine utilisé. Il était considérable dans les expériences de Balsamelli (2 grammes de cholestérine pour 10 cc. de toxine), alors que nos expériences étaient faites avec des volumes égaux d'huile et de toxine (donc 0 gr. 3 de cholestérine pour 10 cc. de toxine). De plus le mélange de Balsamelli devait, à ce taux, avoir la consistance d'une masse sirupeuse. Comment la récupération de la toxine était-elle assurée ? Il est probable que la cholestérine était largement présente dans les mélanges destinés à être dosés par hémolyse. Or, Balsamelli rappelle lui-même au début de son travail les propriétés anti-hémolytiques de la cholestérine. Enfin la toxine qu'il utilisait ne donnait une hémolyse complète qu'à une dilution de 1/10 au plus. C'était une toxine faible et dont la destruction devait être de ce fait, facilitée.

TABLEAU XVI

	Durée de l'agitation	Température	Dose minima hémolytique	Dose minima nécrosante	Dose minima mortelle (lapin)
Toxine 56 + huile pure	6 heures	37°	1/10 cc.	1/5 cc.	5 cc.
Toxine 74 + huile pure	6 heures	15°	1 cc.	1/50 cc.	5 cc.
Toxine 74 + huile pure	6 heures	20°	1/10 cc.	1/100 cc.	5 cc.
Toxine 74 + huile pure	6 heures	20°	2 cc.	1/50 cc.	10 cc.
Toxine 74 + huile pure	2 heures	20°	1 cc.		5 cc.

Notre étonnement fut de voir *l'huile pure*, agitée avec la toxine, faire perdre presque complètement à celle-ci ses trois pouvoirs majeurs (Tableau XVI).

Il était facile de penser que cette action était due aux acides gras contenus dans l'huile pure et peut-être inhibés, sinon neutralisés, dans l'huile contenant la cholestérine à saturation exacte.

En effet, l'expérience montrait que l'huile de vaseline composée d'hydrocarbures (sans aucune fonction acide) était sans action sur la toxine.

	Durée de l'agitation	Température	Dose minima hémolytique	Dose minima mortelle (lapin)	Dose minima nécrosante
Toxine 74					
+ h. vaseline	6 heures	20°	1/1000	0 cc. 20	1/800 cc.

Par contre *l'acide oléique* agit de même façon que l'huile pure. Il est actif à un taux incomparablement plus faible (1 pour 1.000) que la cholestérine dans les expériences de Balsamelli. Mais au-dessus de 1 pour 1.000 il manifeste un pouvoir hémolytique et un pouvoir nécrosant qui lui sont propres et qui masquent l'effet de détoxification qu'il fait subir à la toxine staphylococcique (Tableau XVII).

TABLEAU XVII

Action comparée de l'huile et de l'acide oléique.
(Agitation 6 heures à 37°.)

	agitée avec: Toxine 74	Dose minima hémolytique	Dose minima mortelle	Dose minima nécrosante
Huile pure		1 cc.	10 cc.	1/50
	1 p. 1000	1/10 cc.	5 cc.	1/200
Acide oléique	1 p. 500	1/100	5 cc.	1/200
	1 p. 100	1/200	1 cc.	1/300
Bouillon				
+ acide oléique				
à 1 p. 100		1/200		

L'huile d'œillette neutralisée par la soude ou l'eau de chaux perd-elle ses propriétés destructrices à l'égard de la toxine ?

Il n'en est rien comme le montre l'expérience suivante (Tableau XVIII) :

TABLEAU XVIII

	Durée de l'agitation	Température	Dose minima hémolytique	Dose minima mortelle (lapin)
Toxine 74				
+ huile neutralisée par la soude	6 heures	20°	>1 cc.	>10 cc.
Toxine 74				
+ huile neutralisée par l'eau de chaux	6 heures	20°	>1 cc.	>5 cc.

C'est que l'huile exactement neutralisée par la soude contient en solution une quantité importante de sels d'acides gras ou de savons. Ceux-ci ont les mêmes propriétés sur la toxine que les acides gras eux-mêmes. *Tel l'oléate de soude* qui est actif jusqu'à la dose de 1 pour 1.000. A des doses supérieures il manifeste un pouvoir hémolytique et un pouvoir irritant sinon nécrosant pour le derme (Tableau XIX).

TABLEAU XIX

Oléate de soude	Dose minima hémolytique	Dose minima mortelle (lapin)
1 p. 500	1/100	1 cc.
1 p. 1000	1/100	1 cc.
1 p. 2000	1/500	1 cc.

Ainsi ces expériences qui aboutissent à l'emploi de l'oléate de soude comme agent détoxiquant rejoignent-elles les constatations faites de très longue date par H. Vincent [230] sur les savons.

Les savons sont des corps doués de la fonction « cryptotoxique » selon la dénomination de H. Vincent. Selon cet auteur, ils agiraient plus à la façon d'une pellicule enrobant les molécules toxiques que par une modification chimique de ces molécules. Le pouvoir des toxines serait masqué mais non détruit. En particulier, elles garderaient leur pouvoir antigène sous la forme cryptotoxique.

Nous avons cherché à étudier le *pouvoir antigène de la toxine staphylococcique traitée par agitation avec l'huile d'œillette*. Dès nos premières expériences nous avons constaté que les mélanges centrifugés laissaient reparaître l'huile et la toxine en deux couches distinctes, avec leur limpidité primitive. Mais à l'union des deux liquides se rassemblait une pellicule fragile, de couleur gris-beige assez semblable à la couche leucocytaire qui sépare le plasma des globules quand on centrifuge du sang défibriné. En prélevant avec une pipette fine la partie inférieure représentant la toxine, et séparément la partie supérieure, huileuse, il était possible de recueillir ce fin précipité émulsionné dans un peu de l'huile ayant servi à l'expérience.

Ce précipité était trop abondant pour représenter à lui seul la toxine modifiée. D'ailleurs, il se formait

(et avec une plus grande abondance) quand la toxine était traitée par l'huile cholestérinée qui pourtant la laissait intacte. Il se formait également quand on agitait avec l'huile le bouillon stérile qui avait servi à préparer la toxine. Enfin il n'était pas de nature albuminoïde et ne donnait pas la réaction du biuret.

Mais si ce précipité ne représentait pas la toxine, du moins celle-ci lui était-elle adhérente, sinon chimiquement combinée. En effet, des trois composants, liquide, huile et précipité, seul ce dernier, injecté au lapin, provoque l'apparition d'une immunité spécifique antitoxique.

A la suite d'une expérience de détoxication portant sur 250 gr. de toxine nous avons recueilli séparément la partie aqueuse des mélanges (représentant la toxine originelle) et le précipité émulsionné dans 40 à 50 cc. d'huile de l'expérience. Un lot A de lapins reçut sous la peau 3 injections de 5 centimètres cubes de la partie aqueuse à 15 jours d'intervalle. Un second lot B reçut 3 injections sous-cutanées de 5 cc. du mélange huile+précipité, espacées également d'un intervalle de quinze jours.

Tous ces lapins furent saignés quinze jours après la dernière injection. Leur sérum titrait avant l'expérience moins de 0,1 unité antitoxique par centimètre cube ; après l'expérience, ceux du lot A titraient de 0,5 à 1 U, et ceux du lot B, 5 U, en moyenne : ces derniers résistèrent à 10 à 20 doses mortelles de toxine intra-veineuse, prouvant leur immunisation.

A vrai dire, jamais la détoxication par agitation avec l'huile n'est complète. On peut s'en rendre compte par la persistance d'un léger effet nécrosant de la toxine traitée. Le précipité entraîne un peu de cette toxine résiduelle et quelques animaux qui le reçoivent en injection peuvent présenter de légères escarres. Toutefois seuls ceux qui ont reçu ce précipité en injection présentent une élévation notable du taux antitoxique de leur sérum. Ceux qui reçoivent la partie aqueuse manifestent une immunisation bien moindre, au prix d'un amaigrissement marqué et d'escarres assez fréquentes.

Il résulte de ces expériences que la toxine staphylococcique traitée *in vitro* par l'huile pure perd ses propriétés toxiques en gardant partiellement sa propriété antigène, qui est attachée au précipité formé.

Nous concédons volontiers que l'antigène ainsi obtenu est d'une fabrication laborieuse, reste encore partiellement toxique, et n'a aucune valeur pratique pour l'immunisation des animaux.

Mais nous pouvons supposer que l'injection de la toxine staphylococcique enrobée dans un corps gras subit *in vivo* un processus analogue à celui que nous avons pu analyser *in vitro*, et que la libération fractionnée de cet antigène, par les tissus où il s'est en quelque sorte enkysté, est accompagnée ou précédée d'une détoxication due à l'excipient peut-être autant qu'aux tissus.

Ces résultats ne sont valables que pour la toxine staphylococcique. Nous avons tenté les mêmes essais

	Dose minima mortelle
Toxine originelle	1/20.000
Toxine + huile pure	1/20.000
Toxine + cholestérine	1/20.000
Toxine + acide oléique	1/20.000

avec la toxine tétanique par agitation soit avec l'huile pure, soit avec l'acide oléique à raison de 1 p. 1.000, nous n'avons obtenu en 6 heures à 37°. aucun abaissement du pouvoir toxique.

TROISIÈME PARTIE

*UNITÉ OU PLURALITÉ
DE LA
TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE*

UNITÉ OU PLURALITÉ DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

Nous avons mis au premier plan de cette étude trois propriétés des filtrats de culture staphylococcique : l'hémolyse, la nécrose, la mort rapide par injection intra-veineuse. D'autres propriétés ont été décrites par différents auteurs. Faut-il les attribuer à des substances distinctes ? Parmi elles, quelle est la place de la toxine ?

La toxine du staphylocoque est une exotoxine, sans rapport avec les antigènes des corps microbiens.

Les *staphylocoques desséchés* ne manifestent aucune propriété de la toxine, comme il ressort des expériences suivantes.

Le bouillon habituellement utilisé pour la production de toxine est additionné de 25 grammes de gélose par litre et réparti dans des boîtes de Roux où il fait prise. Cette gélose estensemencée largement avec un staphylocoque toxigène. La moitié du nombre des boîtes (lot n° 1) est placée à l'étuve et parcourue par un courant d'air contenant 20 p. 100 de

CO². L'autre moitié est placée à l'étuve, sans adjonction de CO² (lot n° 2). Après 7 jours de culture, les corps microbiens sont émulsionnés dans l'eau physiologique. On place cette émulsion trois jours sous la cloche à vide en présence d'acide sulfurique. On obtient alors une pellicule sèche jaunâtre que l'on broie dans un mortier stérile. La poudre obtenue est constituée par les corps microbiens desséchés ; la récolte des cultures faites à l'air (n° 2) est 3 à 4 fois plus abondante que celle des cultures sous CO² (n° 1). Après plusieurs semaines de conservation à la glacière en présence d'anhydride phosphorique, on vérifie par ensemencement sur gélose qu'il n'y a plus de microbes vivants. On prépare alors des émulsions de ces corps microbiens en eau physiologique à raison d'un milligramme par centimètre cube de liquide.

Ces émulsions (n° 1 et n° 2) n'ont aucun pouvoir toxique.

L'hémolyse n'a lieu ni avec les globules de lapin ni avec les globules de mouton.

L'injection intra-dermique ne produit qu'une papule inflammatoire sans nécrose.

L'injection intra-cérébrale au cobaye tue l'animal inconstamment et à des doses (1/20 cc.) sans rapport avec l'action habituelle de la toxine.

Les propriétés antigènes des *staphylocoques tués par la chaleur* sont différentes de celles de la toxine. Ces vaccins microbiens font apparaître dans le sé-

rum des animaux des substances précipitantes pour les filtrats de culture. Mais certains sérums qui contiennent un titre élevé de précipitine proviennent d'animaux encore sensibles à l'action de la toxine (Burky [25]). Inversement, les sérums de lapins préparés par la toxine ou l'anatoxine et qui résistent à plusieurs doses mortelles de toxine ne précipitent pas indifféremment tous les filtrats de culture staphylococcique, mais seulement ceux qui contiennent une quantité appréciable de toxine (Burky).

Enfin, le sérum de lapins préparés par des injections microbiennes ne neutralise par la toxine *in vitro* (Gengou [79]).

La toxine est donc un antigène distinct de celui des corps microbiens.

La *leucocidine*, décrite en 1894 par Van de Velde [229], est sécrétée par les staphylocoques *virulents*. Van de Velde injectait dans la plèvre d'un lapin neuf une culture de staphylocoques virulents. Il se produit un exsudat abondant qui contient des leucocytes d'abord vivants, puis (après 6 à 10 heures) des leucocytes morts. Le poison qui tue les leucocytes est sécrété par les staphylocoques dans l'exsudat pleural. En effet, si on recueille cet exsudat, qu'on le centrifuge pour le débarrasser des germes et qu'on y mélange une suspension de leucocytes vivants, ceux-ci meurent à leur tour : en quelques minutes leur protoplasma se clarifie et le noyau devient sphérique. Le même phénomène s'observe avec des fil-

trats de culture au lieu d'exsudat pleural. La leucocidine agit jusqu'à une dilution de 1/1.000. Elle est détruite en quelques minutes par le chauffage à 58°. Elle est antigène, car le sérum des lapins, préparés par des injections d'exsudat pleural ou de filtrat contenant la leucocidine, neutralise celle-ci *in vitro*.

Denys et Van de Velde [51] signalent qu'une action lytique analogue s'exerce sur les cellules de la moelle osseuse, sur les hémato blasts et sur les globules rouges.

La transformation des leucocytes ressemble très fidèlement à celle que Nélis [160] a observée dans les cellules hépatiques des lapins tués par la toxine.

Beaucoup de caractères rapprochent donc la leucocidine et la toxine. Pourtant Neisser et Wechsberg [146] ont constaté que certaines souches ne produisaient pas d'hémolysine mais produisaient la toxine. Ils concluent à la dualité des deux substances. Gengou [83], au contraire, a observé qu'un filtrat, privé d'activité hémolytique et toxique par contact avec des hématies de lapin, a perdu en même temps le pouvoir de détruire les globules blancs. Il en conclut à l'identité de la leucocidine et de la toxine.

Pike [180] a reconnu l'existence dans certains filtrats de staphylocoques d'un pouvoir empêchant la *phagocytose*, sans destruction des leucocytes. Il met en contact dans une pipette capillaire une émulsion microbienne, des leucocytes et le filtrat de culture staphylococcique. Après incubation à 37°, il numère

les microbes inclus dans les polynucléaires et observe ainsi une phagocytose plus faible que dans les tubes témoins, qui ne contiennent pas de filtrat staphylococcique. Cette substance se distinguerait de la leucocidine parce qu'elle n'est pas antigénique, qu'elle résiste à la chaleur et, de la toxine, parce que sa production n'est pas favorisée par la culture sous CO^2 .

Les cultures de staphylocoques provoquent la coagulation du plasma oxalaté, puis une lyse du caillot. Much [143], puis Kleinmilch [122], ont signalé cette propriété. Elle a été surtout étudiée par Gratia [89 et 91 à 94], puis par Van Breuseghem [224 à 228]. Gengou [80] a montré que la staphylocoagulase de Gratia est présente dans les cultures en bouillon oxalaté, centrifugées et chauffées 1/2 heure à 60° , comme dans les cultures totales vivantes.

Les particularités suivantes la distinguent de la toxine (Van Breuseghem [228]) : elle résiste à 100° , elle n'est pas filtrable sur filtre Berkefeld, elle n'est pas adsorbée par les globules rouges, son apparition dans les cultures n'est pas favorisée par le CO^2 , elle est favorisée par l'alcalinité des milieux.

Certains staphylocoques sécrètent une *substance capable de dissoudre la fibrine* (notamment les staphylocoques des suppurations profondes (Madison [136])) et qui serait différente de la staphylocoagulase.

Enfin, certains filtrats de cultures staphylococciques provoquent des *empoisonnements alimentaires*. Ces empoisonnements ont été constatés chez l'homme à la suite d'ingestion d'aliments (lait) souillés de staphylocoques. Après une incubation de trois heures environ, surviennent des vomissements, de la prostration et inconstamment de la diarrhée. En quelques heures les symptômes disparaissent et le malade guérit. Il est possible de reproduire chez le singe un tableau analogue par ingestion, par instillation rectale et même par injection intra-veineuse de filtrats de culture de staphylocoque.

Les staphylocoques qui sécrètent cette substance sont le plus souvent hémolytiques [46]. L'entérotoxine apparaît surtout dans les cultures sous CO² (Wolpert et Dack [234]), ce qui la rapproche de la toxine hémolysante, nécrosante et mortelle. Pourtant selon ces auteurs, certaines souches produisent en abondance la toxine courante, sans produire le poison intestinal. Celui-ci n'est pas neutralisé par le sérum antitoxique. Enfin, le poison gastro-intestinal serait plus résistant à la chaleur que la toxine. Il en résulte que ces substances sont distinctes.

On voit que les filtrats de cultures staphylococciques sont doués de propriétés nombreuses, sans rapport avec la toxine proprement dite. Mais, peut-on définir la toxine par ses trois pouvoirs hémolytique, nécrosant et mortel pour le lapin ? S'agit-il bien d'une substance unique douée de manifestations mul-

tiples ? C'est le problème de *l'unité ou de la pluralité* de la toxine, résolu de façon opposée par divers expérimentateurs.

Burnet [28] a soutenu l'unité de la toxine par des arguments très convaincants : les trois propriétés apparaissent simultanément dans les cultures ; le dosage de l'une permet de prévoir l'activité des deux autres. Enfin et surtout la neutralisation par le sérum antitoxique est égale et proportionnelle pour les trois pouvoirs, quel que soit la toxine et le sérum antistaphylotoxique mis en présence.

Gengou [76] a fortifié l'hypothèse uniciste par des expériences d'épuisement de la toxine par des globules rouges. D'après lui la toxine traitée par les hématies perd son pouvoir sur les leucocytes et les hémato blastes ainsi que son pouvoir mortel.

Nélis [40] met en contact pendant 3 heures à la température du laboratoire 1 cc. de toxine et 10 cc. de globules rouges. Il observe que ce contact fait perdre à la toxine aussi bien ses propriétés hémolytiques que ses propriétés nécrosantes.

Pourtant, à cette conception d'une toxine unique, plusieurs expérimentateurs opposent l'hypothèse d'une *pluralité* des toxines staphylococciques.

Il est fréquent d'observer des irrégularités dans les différentes propriétés de la toxine qui n'ont pas entre elles de rapports invariables.

L'action de la chaleur n'est pas constante sur les filtrats. Les échantillons que nous avons étudiés perdaient leurs propriétés par un chauffage d'une heure

à 55°. Mais nous ne pouvons rejeter les expériences de ceux qui ont observé une résistance très variable des filtrats à la chaleur, qui s'accorde mal avec l'hypothèse d'une toxine unique et toujours identique à elle-même.

Des filtrats provenant de souches différentes ne contiennent pas les mêmes proportions d'hémolysine, de toxine nécrosante, de toxine mortelle pour le lapin. Nous en donnons ci-après un exemple, analogue à celui que citent Parker Weld et Gunther [79].

Nombre de doses minima contenues dans 1 cc. des toxines :

Numéros des toxines	Hémolyse (globules du lapin)	Nécrose	Mort rapide du lapin
56	200	400	2
74	3000	800	10

De telles constatations sont très fréquentes. Sans doute, d'une façon globale, les filtrats les plus hémolytiques sont les plus toxiques, mais il est impossible de prévoir avec précision la dose minima nécrosante d'une toxine lorsqu'on connaît sa dose minima hémolytique ou mortelle. Les écarts entre ces prévisions et la réalité dépassent la marge d'erreur imputable aux procédés de titrage.

Nélis [157] a montré que *l'action du formol* est irrégulière. Il existe des filtrats formolés qui ont perdu leurs propriétés hémolysantes et sont encore mortels pour le lapin en injection intraveineuse. Nélis con-

clut à l'existence d'une « paratoxine » résistante au formol.

Ramon et Richou [198] rapportent des faits analogues observés avec des mélanges apparemment neutres de toxine et d'antitoxine staphylococcique (méthode de floculation). Ils font remarquer que ces mélanges ne tuent pas tous les lapins mais seulement quelques animaux. Ils en concluent que ces mélanges, réellement neutres, ne contiennent pas une variété de toxine qui aurait échappé à la neutralisation, mais tuent certains lapins naturellement hypersensibles par un phénomène de choc.

Nous avons vu l'extrême variabilité *d'action des filtrats sur les différents globules animaux*. Cette variabilité ne peut s'expliquer par la sensibilité différente des hématies selon leur provenance animale. Glenny et Stevens [86] l'expliquent par l'existence de deux toxines staphylococciques α et β dont ils résument les propriétés dans le tableau suivant :

TABLEAU XX

	Toxine α	Toxine β
Globules de mouton.	Hémolyse à 37°.	Parfois légère. Hémolyse à 37°. Hémolyse rapide à froid.
Globules de lapin.	Hémolyse.	Pas d'hémolyse.
Injection intradermique au cobaye.	Nécrose.	Rougeur. Pas de nécrose.
Injection intraveineuse ou intrapéritonéale à la souris.	Pouvoir mortel.	Pas de pouvoir mortel.

Ces deux variétés de toxine sont toutes deux antigènes et les sérums anti α et anti β neutralisent spécifiquement la toxine correspondante.

Morgan et Graydon [142], 1936, ont fait des expériences de fractionnement des globulines des antitoxines. Ils ont ainsi obtenu une antitoxine purifiée et concentrée. Ils disposaient d'autre part de deux toxines. Or, le titre antitoxique de leur sérum purifié s'exprimait par des chiffres différents selon que le dosage était fait en présence de l'une ou de l'autre toxine. Ces auteurs en concluent qu'il existe dans un des deux filtrats une variété de toxine qui échappe à l'action neutralisante de l'antitoxine dont ils se servaient. Aucun de leurs filtrats n'avait d'action sur les globules de mouton. Il ne pouvait donc s'agir de la toxine β de Glenny et Stevens. Morgan et Graydon proposent de conclure à l'existence d'une nouvelle variété de la toxine α qu'ils nomment toxine α^2 .

Des souches différentes peuvent donc produire des toxines qualitativement dissemblables. Ces dissemblances peuvent s'observer sur *différents filtrats provenant d'une même souche*, quand elle est mise en culture dans des milieux différents. Ces faits sont assez rares. Sur un grand nombre de dosages, nous n'avons observé qu'en une seule circonstance la production de toxine dont la dose-test était plus petite en présence de globules de mouton qu'en présence de globules de lapin (tableau VIII, II^e partie, p. 66).

De plus, *la durée de conservation d'une souche « in vitro »* semble modifier parfois la qualité des produits qu'elle élabore : Burky [22] signale le cas d'une souche toxique repiquée pendant deux ans. Durant ce laps de temps, les filtrats de culture changèrent progressivement de caractères : le pouvoir léthal augmenta, le pouvoir hémolytique disparut et les lésions dermiques changèrent d'aspect. Nous n'avons jamais constaté de faits analogues et aucun autre auteur n'en a rapporté, à notre connaissance.

Dans une même culture enfin, Gross [99], contrairement à l'affirmation de Burnet, aurait constaté que les différentes propriétés toxiques n'apparaissent pas simultanément : l'apparition de la nécrotoxine se ferait du premier au quatrième jour, celle de l'hémolysine du quatrième au sixième jour.

J. Parker, Weld et Gunther [179], en traitant 2 cc. de filtrat staphylococcique par 1 cc. de stromas globulaires, ont obtenu la fixation de la leucocidine et de l'hémolysine, sans altération de la toxine nécrosante.

Burky [22] cite le cas d'un filtrat non hémolytique qui tuait le lapin par injection intraveineuse (1 cc. par kilog). Mais le fait même que la mort ne survenait qu'en 24 heures et que Burky a pu répéter ces expériences à plusieurs mois de distance avec le même filtrat conservé à la température du laboratoire, nous fait douter que la mort des lapins fût vraiment due à la toxine staphylococcique. Nous sa-

vons, en effet, que la mort rapide est seule caractéristique des effets de la toxine et que cette toxine perd rapidement ses propriétés, sauf à la glacière.

Les diverses propriétés des filtrats qui avaient été décrites avant la connaissance exacte de la toxine conservent à bon droit, semble-t-il, leur individualité.

La toxine elle-même, définie par son activité hémolytique, nécrosante et mortelle, a-t-elle été démembrée par les hypothèse que nous venons de rapporter ?

La distinction de la toxine α et de la toxine β semble le fait le moins douteux. Les autres anomalies que l'on observe dans les propriétés des filtrats font penser que des substances accessoires accompagnent souvent la toxine. L'intérêt prépondérant que certains leur ont porté obscurcit l'étude de la toxine. Leur rôle dans les affections naturelles à staphylocoques est incertain.

Il est probable que les perfectionnements qui seront apportés aux milieux de culture ou la découverte de souches encore plus toxigènes ne feront qu'accentuer la prééminence dans les filtrats de la toxine hémolysante, nécrosante et mortelle.

CONCLUSIONS

PRÉPARATION DE LA TOXINE

I. — Un petit nombre de staphylocoques est doué de propriétés toxigènes actives. Ni la pigmentation, ni la provenance animale ou humaine des souches n'ont d'influence sur leur aptitude à produire la toxine.

Les staphylocoques isolés de maladies spontanées de l'homme sont peu toxigènes *in vitro*.

II. — La plupart des souches produisent des quantités de toxines plus grandes quand les cultures sont faites sous une atmosphère d'air et de CO² (Burnet). Nous n'avons pu nous affranchir de cette exigence d'aucune façon.

III. — Les milieux liquides nous ont donné les résultats les plus favorables quand ils sont formés de moitié de macération de viande de veau, préparée à la glacière, et moitié de produits de la digestion de panse de porc.

La digestion des panses de porc pendant deux heures est préférable aux temps de digestion plus prolongés.

IV. — Le meilleur pH est de 6,8.

V. — L'addition au bouillon de glucose ou de sels tampons ne nous a pas paru favorable.

VI. — Les cultures répétées dans un même bouillon et les cultures à l'intérieur d'un sac de cellophane plongé dans du bouillon, ne nous ont pas permis d'améliorer la production de la toxine.

PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE

I. — La toxine staphylococcique est *hémolytique*, surtout pour les hématies de lapin, ce qui permet son titrage. L'hémolyse des globules rouges d'autres animaux se produit avec une irrégularité qui ne peut être expliquée par une sensibilité inégale des différents globules. La fixation de la toxine sur les hématies est inconstante. Elle peut s'observer sans que la lyse survienne.

II. — *L'action nécrosante* de filtrats de culture est le reflet le plus fidèle des propriétés des staphylocoques pathogènes. Il est possible de titrer la toxine staphylococcique par injection intra-dermique au lapin.

III. — *L'injection intra-veineuse de toxine au lapin* entraîne la mort de l'animal. Seule la mort rapide, en moins d'une heure, est caractéristique de l'action de la toxine. Le mode d'action de la toxine évoque une certaine ressemblance avec le choc anaphylactique.

L'action convulsivante et l'action sur les centres cardiaque et respiratoire soulignent l'affinité neurotrophe de la toxine.

IV. — Nous avons constaté une destruction nette et constante de la toxine par chauffage à 55°. De nombreux expérimentateurs ont constaté des effets très variables du chauffage des toxines.

V. — Le vieillissement des filtrats produit une chute du pouvoir toxique plus rapide que celle du pouvoir antigène. Il en résulte que le titrage des toxines en présence de sérum anti-toxique n'est valable que pour les toxines fraîches.

VI. — Parmi les actions de diverses substances chimiques, nous avons étudié celles de l'huile pure, de l'acide oléique et des savons. Ces corps produisent une destruction du pouvoir toxique avec conservation relative du pouvoir antigène.

VII. — L'étude de l'*unité* ou de la *pluralité* des toxines staphylococciques mène à conclure que plusieurs substances antigènes, de rôle accessoire, accompagnent la toxine vraie dans les filtrats de culture.

Vu :
LE DOYEN,
ROUSSY.

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
DEBRÉ.

Vu et permis d'imprimer :
LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFREMOW et PILOT. — Journ. Inf. Dis., XLV, 1929, 167.
2. AITOFF. — C. R. Soc. Biol., CXVI, 1934, 1026.
3. ALECHINSK. — C. R. Soc. Biol., CXXIII, 1936, 148.
4. ALESSANDRINI et SABATUCCI. — An. d'Ig., 1931, XLI, 29.
5. ARONSON. — C. R. Soc. Biol., LXXXIII, 1920, 1082.
6. BACHMAN et OGAIT. — Zentralbl. f. Bakt., CXXXIV, 1935, 281.
7. BALSAMELLI. — Bolletin Sez. Ital. Soc. Internat. Microb., VII, 1935, 203.
8. — Id.
9. BIANCHINI. — Giorn., Batt. e Immunol., 1936, 16.
10. BIGGER. — Journ. of Path. a Bact., XXXVI, 1933, 87.
11. BIGGER, BOLAND, O'MEARA. — Journ. of Path. a Bact., XXX, 1927, 271.
12. BOCAGE et MERCIER. — C. R. Soc. Biol., CXXI, 1936, 937.
13. — Id., CXXII, 1936, 1270.
14. H. BONNET et THIEFFRY. — C. R. Soc. Biol., CXVIII, 1935, 1062.
15. H. BONNET, THIEFFRY, Mlle MONTEFIORE. — C. R. Soc. Biol., CXX, 1935, 1058.
16. — Id., CXXIII, 1936, 781.
17. — Id. CXXII, 1936, 1004.

- 17 *bis*. BONNET, THIEFFRY, Mlle SABATAY. — C. R. Soc. Biol., CXXIV, 1937, 240.
18. BORTHWICK. — Brit. Journ. of Experim. Path., XIV, 1933, 236.
19. BRUTSAERT. — Arch. Internat. Pharmac. et Thérap., XXVIII, 1923, 235.
20. BRYCE et BURNET. — Journ. of Path. a. Bact., 1932, XXXV, 183.
21. BRYCE et ROUNTREE. — Journ. of Path. a. Bact., XLIII, 173.
22. BURKY. — Journ. of Immunol., XXIV, 1933, 93.
23. — Id., XXIV, 1933, 115.
24. — Id., XXIV, 1933, 127.
25. — Id., XXV, 1933, 419.
26. — Proceed. Soc. Experim. Biol., XXI, 1934, 445.
27. — Journ. Allergy, V, 1934, 466.
28. BURNET. — Journ. of Path. a. Bact., XXXII, 1929, 717.
29. — Id., XXXIII, 1930, 1.
30. — Id., XXXIV, 1931, 471.
31. — Id., XXXIV, 1931, 759.
32. BURNET et FREEMAN. — Journ. of Path. a. Bact., XXXV, 1932, 477.
33. BURNET et KELLAWAY. — Med. Journ. of Australia, II, 1930, 295.
34. BURNET et LUSCH. — Journ. Path. a. Bact., XL, 1935, 455.
35. CARLINFANTI. — C. R. Soc. Biol., CXX, 1935, 942.
36. — Id., CXX, 1935, 1055.
37. CERALEK et FEJGIN. — C. R. Soc. Biol., CXXII, 1936, 133.
38. — Id., CXXII, 1936, 137.
39. DE CISNEROS et URGOITI. — Arch. de Med. Chirurg. y Especial, XXXVIII, 1935, 727.

40. COMBIESCO, ISTRATI, N. COMBIESCO. — C. R. Soc. Biol., CXIV, 1933, 292.
41. — Id., CXIX, 1935, 626.
42. COMBIESCO, ISTRATI, POP, N. COMBIESCO. — *Iliesco*, CXXI, 1936, 177.
43. CONNOR et Mc KIE. — *Journ. Path. a. Bact.*, XXXIV, 1933, 353.
44. — *Brit. Journ. Dermat.*, XLVI, 1934, 20.
45. COURMONT. — C. R. Soc. Biol., I, 1894, 782.
46. CRABTREE et LITTERER. — *Am. Journ. Publ. Health*, XXIV, 1934, 1116.
47. DACK, JORDAN, WOOLPERT. — *Journ. of Prévent. Med.*, V, 1931, 151.
48. DEBRÉ, BONNET, THIEFFRY. — *Paris Médical*, XXIII, 1936, 494.
49. DEBRÉ, BONNET, THIEFFRY, SABETAY. — C. R. Soc. Biol., CXIX, 1935, 792.
50. DELAUNAY. — *Gaz. Hôpit. Nantes*, 1936, n° 11.
51. DEMYS et VANDE VELDE. — *La Cellule*, XI, 1895, 357.
52. DESCAZEUX et RICHON. — *Bull. Acad. Vétérinaire de France*, VIII, 1935, 374.
53. DJOURICHITCH. — C. R. Soc. Biol., CXXII, 1936, 609.
54. — Id., CXXII, 1936, 1168.
55. DOLMAN. — *Canad. Publ. Healt Journ.*, XXIII, 1932, 125.
56. — *Stud. from. Conn. labor.*, V, 1932, 309.
57. — *Journ. Americ. Med. Assoc.*, C, 1933, 1007.
58. — *Journ. Infect. Dis.*, LV, 1934, 172.
59. — *Lancet*, CCXXVIII, 1935, 306.
60. DOLMAN et KITCHING. — *Journ. Path. a Bact.*, XLI, 1935, 137.
61. DUDGEON et BRAMFORTH. — *Brit. Journ. Hyg.*, XXIII, 1925, 375.

62. DUDGEON et GOADBY. — *Brit. Journ. Hyg.*, XXX, 130, 180.
63. DUDGEON et SIMSON. — *Brit. Journ. Hyg.*, XXVII, 1928, 160.
64. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et KOSSOVITCH. — *C. R. Soc. Biol.*, CXII, 1933, 241.
65. DUMAS. — *An. I. P.*, XXVIII, 1914, 213.
66. EPSTEIN. — *Arch. f. Dermat.*, CLXX, 1934, 586.
67. FLAUM et FORSSMAN. — *Acta. Path. et Microb. scand.*, XIII, 1936, 263.
68. FORSSMAN. — *Acta. path. et microb. scand. Suppl.*, XI, 1932, 202.
69. — *Biochim. Zeitschr.*, CCLXV, 1933, 291.
70. — *C. R. Soc. Biol.*, CXVII, 1934, 639.
71. — *Acta Path. et Microb. scand.*, XI, 1934, 214.
72. — *Id.*, XI, 1934, 452.
73. — *Id.*, XII, 1935, 530.
74. — *Id.*, XII, 1935, 536.
75. — *XXVI*, 1936, 116.
76. GENGOU. — *Arch. Internat. Méd. exp.*, IV, 1930, 633.
77. — *Id.*, VI, 1931, 211.
78. — *An. I. P.*, XLVIII, 1932, 19.
79. — *Id.*, XLVIII, 1932, 135.
80. — *Id.*, LI, 1933, 14.
81. — *Id.*, LIV, 1935, 428.
82. — *Id.*, LV, 1935, 129.
83. — *Arch. Internat. méd. exp.*, IX, 1935, 413.
- 83 bis. GILDEMEISTER. — *Zentr. f. Bakt.*, CXXXIII, 1934, 101.
84. GLADSTONE, FILDES, RICHARDSON. — *Brit. Journ. of experim. Path.*, XVI, 1935, 335.
85. VON GLAHN et WELD. — *Journ. of experim. Med.*, LXI, 1935, 1.

86. GLENNY et STEVENS. — Journ. Path. a. bact., XL, 1935, 201.
87. GOMEZ, DE CISNEROS. — Urgoiti. arch. de méd. Chirurg. y Esp., 1935, 195.
88. GRATIA. — C. R. Soc. Biol., LXXXII, 1919, 1245.
89. — Id., LXXXII, 1919, 1247.
90. — Id., LXXXII, 1919, 1393.
91. — Id., LXXXIII, 1920, 584.
92. — C. R. Soc. Biol., LXXXIII, 1920, 585.
93. — Id., LXXXIII, 1920, 649.
94. — Id., LXXXIII, 1920, 1221.
95. GROSS. — Z. Immun.forsch., LIX, 1928, 510.
96. — Zentr. f. Bakt., CVII, 1928, 198.
97. — Id., CIX, 1929, 479.
98. — Klin. Wochenschr., 1929, 1079.
99. — Zentr. f. Bakt., CXV, 1930, 367.
100. — Z. Immun.forsch., LXXIII, 1931, 14.
101. — Zentr. f. Bakt., CXXIII, 1931, 212.
102. — Id., CXXII, 1931, 354.
103. — Hyg. Bakt. Immun.forsch., XIII, 1932, 516.
104. — Z. Immun.forsch., LXXIX, 1933, 163.
105. — Klin. Wochenschr., XXIII, 1933, 907.
106. — Id., XXIII, 1933, 304.
107. HARTLEY. — Brit. Journ. Exp. Path., VII, 1926, 55.
108. HOLM. — Journ. of Immun., XXIX, 1935, 209.
109. HOLM, ANDERSON, LEONHARD. — Proc. Soc. Biol. a Méd., XXXIV, 1936, 502.
110. HORSE. — Journ. of experim. Med., I, 1896.
111. JAMIESON et POWELL. — Americ. Journ. of Hyg., XIX, 1934, 246.
112. JAUBERT et GOY. — Presse Médicale, 1928 (n° 56).
113. — Concours Médical, 1932 (n° 22).
114. JORDAN et BURROWS. — Soc. f. exp. Biol., XXX, 1933, 448.

115. JORDAN DACK et WOOLPERT. — Journ. of prevent. Med., V, 1931, 383.
116. JULIANELLE. — Journ. infect. Dis., XXXI, 1922, 256.
117. JULIANELLES, JONES, HARTMANN. — Soc. Experim. Biol. a. med., XXXII, 1935, 945.
118. JULIANELLE et WIEGHARD. — Soc. Exp. Biol. a. med., XXXI, 1934, 947.
119. KATO et MUROO. — Mitteil. Med. Akad. Kioto, XII, 1934, 1330.
120. KELLAWAY, BURNET, WILLIAMS. — Journ. of. Path. a. bact., XXXIII, 1930, 889.
121. KITCHING et FARRELL. — Americ. Journ. Hyg., XXIV, 1936, 268.
122. KLEINMILCH. — Z. Immun. forsch., III, 1909, 516.
123. KLOPSTOCK. — Z. Immun. forsch., LXXXVI, 1935, 213.
124. KOBACK et PILOT. — Soc. for. experim. Biol. a. med., XXVIII 1931, 584.
125. LE FÈVRE DE ARRIC. — C. R. Soc. Biol., LXXXII, 1919, 1313.
126. — Id., LXXXII, 1919, 1331.
127. — Arch. Internat. Pharmac. et therap., XXVII, 1922, 277.
128. LÉONHARD et HOLM. — Journ. Path. a. bact., XXIV, 1935, 45.
129. LESBRE. — C. R. Soc. Biol., XCIV, 1926, 1222.
130. LEWIN (E. M.), LEWIN (I. M.), RABINOWITSCH. — Dermat. Zeitschr., LXX, 1934, 82.
131. LOISEAU et PHILIPPE. — C. R. Soc. Biol., CIX, 1932, 168.
132. — Id., CIX, 1932, 266.
133. — Id., CXII, 1933, 131.
134. — Id., CXII, 1933, 426.
135. — Id., CXVI, 1934, 1214.

136. MADISON. — Soc. Experim. Biol. a. med., XXXIII, 1935, 209.
137. MENKIN. — Journ. Experim. Med., LVII, 1933, 977.
138. — Soc. Exp. Biol. a. med., XXXIII, 1934, 162.
139. MENKIN et WATSON. — Soc. Exp. Biol. a. Med., XXXII, 1935, 1259.
140. MERCIER. — Thèse Paris, 1937 (Vigot, édit.).
141. MINNETT. — Journ. Path. a. bact., XLII, 1936, 247.
142. MORGAN et GRAYDON. — Journ. Path. a. Bact., XLIII, 1936, 385.
143. MUCH. — Biochem. Zeitschr., 1908, Bd. XIV.
144. MURRAY. — Lancet, 1935, 305.
145. NAIDU. — Zentr. f. Bakt., CXXXII, 1934, 47.
146. NEISSER et WECHSBERG. — Zeitschr. f. Hyg., XXXVI, 1901, 399.
- 146 bis. NEISSER. — Handbuch der pathogenen Microorganismen, 1903.
147. NELIS. — C. R. Soc. Biol., CXIII, 1933, 7.
148. — Id., CXIII, 1933, 598.
149. — Id., 1933, 1157.
150. — Id., CXIII, 1933, 1321.
151. — Revue belge Sc. Méd., VI, 1934, 358.
152. — C. R. Soc. Biol., CXVII, 1934, 756.
153. — Revue d'Immunologie, I, 1935, 152.
154. — C. R. Soc. Biol., CXVIII, 1935, 212.
155. — Id., CXVIII, 1935, 1384.
156. — Id., CXXI, 1936, 725.
157. — Id., CXXI, 1936, 807.
158. NÉLIS et BONNET. — C. R. Soc. Biol., CXVII, 1934, 866.
159. — Id., CXVIII, 1935, 136.
160. NÉLIS, BOUCKAERT, PICARD. — An. I. P., LII, 1934, 597.
161. NÉLIS et PICARD. — C. R. Soc. Biol., CXIII, 1933, 1321.

162. — C. R. Soc. Biol., CXX, 1935, 610.
163. NÉLIS et PONCELET. — C. R. Soc. Biol., CXVIII, 1935, 312.
164. NÉLIS et DE WEERDT. — Id., CXX, 1935, 394.
165. NICOLLE et CÉSARI. — Arc. I. P., XXVIII, 1914, 219.
166. ORCUTT et HOWE. — Journ. Experim. Med., XXXV, 1922, 409.
167. PANAYOTATOU. — C. R. Soc. Biol., CIX, 1932, 194.
168. PANTON et VALENTINE. — Brit. Journ. Exp. Path., X, 1929, 257.
169. — Lancet, CCXXII, 1932, 506.
170. PANTON, VALENTINE, DIX. — Lancet, CCXXI, 1931, 1180.
171. PARISH et CLARK. — Journ. Path. Bact., XXXIV, 1931, 593.
172. — Journ. Path. a. Bact., XXXV, 1932, 251.
173. PARISH, O'MEARA, CLARK. — Lancet, CCXXVI, 1934, 1054.
174. PARKER. — Journ. Exp. Med., XL, 1924, 761.
175. — Soc. Exp. Biol. a. med., XXII, 1924, 14.
176. — Journ. of. Path. a. bact., X, 1924, 761.
177. PARKER et BANZHAF. — Journ. Immun., XIII, 1927, 215.
178. PARKER, HOPKINS GUNTHER. — Soc. for. exp. Biol. a. med., XXIII, 1925, 344.
179. PARKER, WELD, GUNTHER. — Journ. of. exp. med., LIV, 1931, 315.
180. PIKE. — Journ. of. Immunol., XXVI, 1934, 69.
181. PODETTI. — Giorn. Batter., XV, 1935, 633.
182. POPESCO. — C. R. Soc. Biol., LXXXIX, 1923, 259.
183. RAMON. — C. R. Soc. Biol., CXII, 1933, 8.
184. — Id., CXXI, 1936, 375.
185. RAMON, BOGAGE, RICHOU, MERCIER. — R. Immunol., II, 1936, 551.

186. RAMON, BOIVIN, RICHON. — C. R. Acad. Sc., CCIII, 1936, 634.
187. RAMON, BONNET, NÉLIS, RICHOU, THIEFFRY. — C. R. Soc. Biol., CXIX, 1935, 790.
188. RAMON, DJOURICHITCH, RICHON. — C. R. Soc. Biol., CXXII, 1936, 1160.
189. RAMON, GERNEZ, RICHOU, PANNEQUIN. — R. Immunol., II, 1936, 566.
190. RAMON, NÉLIS. — C. R. Soc. Biol., CXVI, 1934, 1250.
191. RAMON, NÉLIS, BONNET. — C. R. Soc. Biol., CXIX, 1935, 787.
192. RAMON, NÉLIS, RICHOU. — C. R. Soc. Biol., CXVIII, 1935, 738.
193. — Id., CXIX, 1935, 1306.
194. RAMON et RICHOU. — C. R. Soc. Biol., CXX, 1935, 290.
195. — An. I. P., LIV, 1935, 519.
196. — C. R. Soc. Biol., CXXI, 1936, 379.
197. — Id., CXXI, 1936, 517 et 621.
198. — Id., CXXI, 1936, 1064.
199. RAMON, RICHOU, DESCAZEUX. — R. Immunol., I, 1935, 401.
200. RAMON, RICHOU, DJOURICHITCH. — C. R. Soc. Biol., CXXI, 1936, 1559.
201. — Id., CXXII, 1936, 1164.
202. — R. Immunol., II, 1936, 482.
203. RAMSAY et TRACY. — Soc. Exp. Biol. a. med., XXVIII, 1930, 390.
204. REME. — Z. f. Immun.forsch., LXIX, 1930, 25.
205. — Mon. f. Kinderh., XLVIII, 1930, 70.
206. RICHOU. — C. R. Soc. Biol., CXXIII, 1936, 741.
207. RIGANO et NICLOTTI. — Giorn. Batter., XI, 1933, 529.

208. RIGDON JOYNER RICKETTS. — *Am. Journ. Path.*, X, 1934, 425.
209. RODET et COURMONT. — *C. R. Soc. Biol.*, 1892, 46.
210. ROSENTHAL et PATAI. — *Zentr. f. Bakt.*, LXXIII, 1914, 406.
211. RUSS. — *Zeitschr. f. Exp. Path. u. Therap.*, XVIII, 1916, 220.
212. SCHWARTZ. — *C. R. Soc. Biol.*, CXX, 1935, 1085.
213. — *Id.*, CXXII, 1936, 1006.
214. SEIFFERT. — *Zentralbl. f. Bakt.*, CXXXV, 1935, 100.
215. SMITH. — *Journ. Path. a. Bact.*, XLII, 1936, 227.
216. STRITAR et JORDAN. — *Journ. Infect. dis.*, LVI, 1935, 1.
217. STEVENS et CARP. — *Soc. Exp. Biol. a. med.*, XXIV, 1926, 592.
218. TRAVASSOS. — *C. R. Soc. Biol.*, CXIV, 1933, 369.
219. — *Id.*, CXIV, 1933, 371.
220. — *Id.*, CXV, 1934, 1354.
221. — *Id.*, CXV, 1934, 1356.
222. — *Id.*, CXVII, 1934, 717.
223. URBAIN. — *C. R. Soc. Biol.*, XCI, 1924, 341.
224. VANBREUSEGHEM. — *C. R. Soc. Biol.*, CXI, 1932, 159.
225. — *Id.*, CXV, 1934, 1235.
226. — *Id.*, CXV, 1934, 1237.
227. — *Id.*, CXVI, 1934, 344.
228. — *Id.*, CXVI, 1934, 650.
229. VAN DE VELDE. — *La Cellule*, X, 1894, 403.
230. VINCENT. — *C. R. Soc. Biol.*, CXIII, 1933, 968.
231. WALBUM. — *C. R. Soc. Biol.*, LXXXV, 1921, 376.
232. — *Id.*, LXXXV, 1921, 1205.
233. — *Biochem. Zeitschr.*, CXXIX, 1922, 367.
234. WOLPERT et DACK. — *Journ. infect. Dis.*, LII, 1933, 6.
235. YATO. — *Journ. Orient. Med.*, XXII, 1935, 9.

Table des Matières

INTRODUCTION	9
------------------------	---

PREMIERE PARTIE

PRODUCTION DE LA TOXINE	13
<i>Chapitre premier.</i> — Choix des souches de staphylocoques	15
<i>Chapitre II.</i> — Atmosphère de CO ²	23
<i>Chapitre III.</i> — Milieux de culture.	29
<i>Chapitre IV.</i> — Rôle de la peptone et des acides aminés	34
<i>Chapitre V.</i> — Rôle du pH.	40
<i>Chapitre VI.</i> — Rôle du glucose.	46

DEUXIEME PARTIE

PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE	59
<i>Chapitre premier.</i> — Pouvoir lytique	62
<i>Chapitre II.</i> — Pouvoir nécrosant	74
<i>Chapitre III.</i> — Pouvoir pathogène expérimental.	79
<i>Chapitre IV.</i> — Actions physiques sur la toxine.	88
<i>Chapitre V.</i> — Actions chimiques sur la toxine.	92

TROISIEME PARTIE

UNITÉ OU PLURALITÉ DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE	107
CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAPHIE	125



BOSO FRÈRES, M. & L. RICU

°° °° °° IMPRIMEURS-ÉDITEURS °° °° °°

°° **42, QUAI GAILLETON, 42** °°

°° °° °° °° **LYON** °° °° °° °°



